

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CAMPUS SOBRAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS LECTINAS DE SEMENTES DE  
*Erythrina fusca* e *velutina*, DE ALGAS MARINHAS *Hypnea musciformes*,  
*Bryothamnion seaforthii* e *triquetrum* E DO PRODUTO NATURAL  
DITERPENÓ CASBANO, EM CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

RICARDO HIDEO TOGASHI

SOBRAL – CEARÁ  
2010

RICARDO HIDEO TOGASHI

ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS LECTINAS DE SEMENTES DE  
Erythrina fusca e velutina, DE ALGAS MARINHAS Hypnea musciformes,  
Bryothamnion seaforthii e triquetrum E DO PRODUTO NATURAL  
DITERPENO CASBANO, EM CULTURAS DE Pseudomonas aeruginosa.

Dissertação submetida à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal do Ceará como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto

SOBRAL  
2010



T645a Togashi, Ricardo Hideo

Atividade biológica das lectinas de sementes de *erythrina fusca* e *velutina*, de algas marinhas *hypnea musciformes*, *bryothamnion seaforthii* e *triquetrum* e do produto natural diterpeno casbano, em culturas de *pseudomonas aeruginosa*. / Ricardo Hideo Togashi. - 2010. 82 f. il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Pós-graduação em Biotecnologia, Sobral (CE), 2010.

Orientação: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.

1-PSEUDOMONAS AERUGINOSA. 2- LECTINA. 3- DITERPENOS. I - PINTO, VICENTE DE PAULO TEIXEIRA (ORIENT.) II - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA. III - TÍTULO.

CDD 579.8

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central e na Biblioteca do Curso de Medicina-Campus de Sobral, da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que sejam respeitadas as normas da ética científica.

Ricardo Hideo Togashi

Dissertação aprovada em    /    / 2010

---

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto  
Orientador da Dissertação

---

Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho  
Examinador (UFC)

---

Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos  
Conselheiro  
Examinador (UVA)

“Nunca se afaste de seus sonhos. Porque se eles forem, você continuara vivendo, mas  
terá deixado de existir”.

Mark Twain.

A minha esposa Ivana (eterna companheira)  
e a nossos filhos Felipe / Iara (nossos tesouros).

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto pela atenção e paciência durante as discussões e revisões.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, pelo acolhimento no laboratório de Imunologia do Núcleo Biotecnologia Sobral e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos da Universidade Vale do Acaraú, por ter cedido o composto diterpeno casbano para este estudo.

Aos meus colegas Mayron Alves de Vasconcelos, Vasiliepe e Fabiano Fazanaro, que me ajudaram na realização deste projeto e estiveram do meu lado durante este período.

Aos meus pais Kempe Togashi (*in memoriam*) e Cazue Togashi por terem me ensinado o valor da educação.

A todos os colegas do mestrado de biotecnologia da UFC campus de Sobral que fizeram parte da minha vida durante este período.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que viabilizaram os experimentos realizados nos laboratórios do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará-*Campus* de Sobral, bem como pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos a nosso laboratório.

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP), através dos convênios mantidos com vários pesquisadores de nosso grupo de pesquisa da Universidade Federal do Ceará-*Campus* de Sobral.

Ao BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pela colaboração fundamental na realização deste trabalho. Pelo isolamento das lectinas utilizadas neste trabalho e pelo apoio constante.

## RESUMO

Neste trabalho avaliamos a atividade biológica de lectinas de sementes de *Erythrina fusca* e *velutina*, de algas marinhas *Hypnea musciformes*, *Bryothamnion seaforthii* e *triquetrum* e do diterpeno casbano, um produto natural isolado de *Croton nepetaefolius*, sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Foi comparada a ação *in vitro* das 5 lectinas e do diterpeno casbano, sobre colônias de *P. aeruginosa*, em placas de poliestireno. Investigada a ação das lectinas de alga marinha *H.musciforme*, de sementes de *Erythrina velutina*, e do diterpeno casbano, no processo de formação do biofilme bacteriano de *P.aeruginosa*, em placas de poliestireno; e identificado entre as lectinas de *E.velutina*, *H.musciforme* e diterpeno casbano, aquele com maior potencial de aplicação no controle do crescimento de colônias de *P. aeruginosa*. As lectinas testadas não foram capazes de inibir o crescimento e a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* nas condições experimentadas. Por outro lado, diterpeno casbano, na concentração de 500 µg/mL em 18 horas, foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* em 40%, comparado ao controle positivo. Esta inibição foi observada até uma concentração de 125 µg/mL. Entretanto, não foi observada inibição da formação do biofilme da *P. aeruginosa* nas concentrações utilizadas neste estudo.

Palavras - chave: *Pseudomonas aeruginosa*; lectina; diterpeno.

## ABSTRACT

In this study the biological activity of seeds lectins from *Erythrina velutina* and *fusca*, marine algae *Hypnea musciformis*, *Bryothamnion seaforthii* and *triquetrum* and the diterpene casbane, a natural product isolated from *Croton nepetaefolius* was evaluated upon *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. We compared the in vitro effect of lectins and diterpene casbane on colonies of *P. aeruginosa* in microtiter plates. Investigated the action of lectins from marine algae *H. musciforme* of seeds of *Erythrina velutina*, and diterpene casbane in the process of formation of *P. aeruginosa* biofilm on polystyrene plates, and identified among lectins: *E. velutina*, *H. musciforme* and diterpene casbane, the one with greater potential for application in controlling the growth of colonies of *P. aeruginosa*. The lectins tested were able to inhibit growth and biofilm formation of *P. aeruginosa* in the studied conditions. Moreover, diterpene casbane at a concentration of 500 mg/mL in 18 hours, was able to inhibit the growth of *P. aeruginosa* in 40%, compared to positive control. This inhibition was observed until a concentration of 125 mg/mL. However, the inhibition of biofilm formation of *P. aeruginosa* there was no observed at the concentrations used in this study.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; lectin; diterpene.

## LISTA DE FIGURAS

1	Diagrama de formação de biofilme adaptado de Stoodley <i>et al.</i> , 2002.....	23
2	Classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995) e Van Damme <i>et al.</i> (1998).....	27
3	Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas vegetais. Adaptada de Peumans <i>et al.</i> , (1998).....	32
4	Fotografia de arbustos de <i>Croton nepetaefolius</i> Baill.....	34
5	Esqueletos dos diterpenos isolados de espécies de <i>Croton</i> .....	35
6	Estruturas de diterpenos casbano isolados da família Euphorbiaceae .....	38
7	Diterpeno casbano.....	39
8	Espectro na região do IV do diterpeno casbano.....	41
9	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do diterpeno casbano.....	41
10	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do THCN-3 diterpeno casbano.....	42
11	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do diterpeno casbano ....	42
12	Espectro de massas do diterpeno casbano.....	43
13	Fotografia de um coágulo obtido após incubação de <i>Hypnea musciformis</i> com hemácias de coelho a 2% tratada com tripsina.....	51

## LISTA DE GRÁFICO

1	Atividade da lectina de sementes de <i>Erythrina velutina</i> (1mg/mL) sobre o crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	52
2	Atividade da lectina de sementes de <i>Erythrina velutina</i> (500 µg/mL) sobre o crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	52
3	Atividade da lectina de <i>Erythrina fusca</i> (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	53
4	Atividade da lectina de <i>Erythrina fusca</i> (500 µg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	53
5	Atividade da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	54
6	Atividade da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> (500µg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	54
7	Atividade da lectina de <i>Bryothamnion seaforthii</i> (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	55
8	Atividade da lectina de <i>Bryothamnion seaforthii</i> (500 µg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	55
9	Atividade da lectina de <i>Hypnea musciformis</i> (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	56
10	Atividade da lectina de <i>Hypnea musciformis</i> (500 µg/mL) sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	56
11	Atividade do diterpeno casbano nas diferentes concentrações sobre o crescimento microbiano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	57
12	Ensaio de formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 após 12 horas de incubação nos meios Brain Heart Infusion (BHI), Luria-Bertani (LB) e Tryptic Soy Brouth (TSB). .....	58
13	Ensaio de formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 após 24 horas de incubação nos meios Brain Heart Infusion (BHI), Luria-Bertani (LB) e Tryptic Soy Brouth (TSB). .....	58
14	Atividade da lectina de sementes de <i>Erythrina velutina</i> (1mg/mL) sobre a formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	59
15	Atividade da lectina de <i>Hypnea musciformis</i> (1mg/mL) sobre a formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	59

16	Atividade do diterpeno casbano nas diferentes concentrações sobre a formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	<b>60</b>
----	---	-----------

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1** - Correlação entre as espécies e as atividades farmacológicas de diterpenos casbanos isolados da família Euphobiaceae relatados na literatura.

**Tabela 2** - Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **(1)** em CDCl<sub>3</sub>. Os deslocamentos químicos em  $\delta_C$  e  $\delta_H$  estão em ppm e constantes de acoplamento ( $J$ , entre parênteses) em Hz.

**Tabela 3** - Lectinas de acordo com especificidade por carboidratos e referência

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BGNMF	Bacilo gram negativo não fermentador
LPS	Lipopolissacarídeo
SENTRY	Sentry antimicrobial surveillance program
MR	Multirresistente
EPS	Substância polimérica extracelular
BHI	Brain Heart Infusion
LB	Luria-Bertani
TSB	Tryptic Soy Brouth
UFC/ML	Unidades formadoras de colônia por mililitro
ATCC 10145	American type culture collection 10145
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Percentual de inibição
SBF	Soro bovino fetal
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
UTI	Unidade Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

	Página
1.1	REVISÃO LITERATURA..... 16
1.1.1	Histórico e características gerais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... 16
1.1.2	Epidemiologia das infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... 18
1.1.3	Resistência antimicrobiana em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... 21
1.1.4	Biofilme bacteriano..... 22
1.1.5	LECTINAS..... 26
1.1.5.1	Definição..... 26
1.1.5.2	Ocorrência e atividade biológica de lectinas..... 28
1.1.5.3	Características gerais das lectinas vegetais..... 31
1.2	Diterpeno Casbano..... 33
1.2.1	Definição..... 33
1.2.2	Determinação estrutural do diterpeno casbano..... 39
2	OBJETIVOS..... 44
2.1	Geral..... 44
2.2	Específicos..... 44
3	MATERIAL E MÉTODOS..... 45
3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... 45
3.2	Isolamento das lectinas / diterpeno casbanos..... 45
3.3	Procedimentos experimentais gerais..... 45
3.4	Isolamento do diterpeno casbano ..... 46
3.5	Cultura Bacteriana..... 46
3.6	Determinação da atividade hemaglutinante das lectinas..... 47
3.7	Ensaio de Atividade Antibacteriana (MIC)..... 47

3.8	Ensaio da formação do biofilme bacteriano utilizando diferentes meios de cultura.....	48
3.9	Ensaio de inibição da formação do biofilme bacteriano em placas de poliestireno (96 poços) usando lectinas/diterpeno casbano.....	49
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Atividade hemaglutinante.....	51
5.2	Atividade Antibacteriana .....	51
5.3	Ensaio da formação do biofilme bacteriano utilizando diferentes meios de cultura.....	57
5.4	Inibição da formação de biofilme bacteriano em placas de 96 poços de poliestireno através do tratamento com a lectinas.....	58
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO.....	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## 1.1 REVISÃO LITERATURA:

### 1.1.1 Histórico e características gerais de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*, Bacilo gram negativo não fermentador (BGNNF), aeróbio estrito (exceto em presença de nitrato, circunstância em que cresce em condições anaeróbias), não esporulados, não utilizam carboidrato como fonte de energia ou os degradam não por fermentação, mas pela via oxidativa.

Os BGNNF raramente causam infecções comunitárias sendo relacionados predominantemente às infecções hospitalares. Dentre as principais características deste grupo podem - se alinhar: as biológicas, tendo o microorganismo mínimas necessidades nutricionais, a tolerabilidade às variações de condições físicas e a capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos e de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Microorganismos móveis com flagelos polares. A família *pseudomonadaceae*, cuja maioria possuem vida livre, podendo infectar diversas espécies de plantas e animais, sendo somente algumas espécies patogênicas para o ser humano. O gênero *Pseudomonas* inclui espécies fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, entre outras) e não fluorescentes (*P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, entre outras). Apesar dos 03 membros (*aeruginosa* / *fluorecens* / *putida*) produzirem pioverdina apenas a *P. aeruginosa* produz piocianina a qual impede o crescimento de outras bactérias, elimina a atividade ciliar respiratória e produz danos oxidativos nos tecidos oxigenados (PALLERONI, 1998).

As primeiras observações clínicas relacionadas à *P. aeruginosa* ocorreram no campo das infecções relacionadas à assistência à saúde, quando SÉDILLOT (1850) descreveu que a secreção verde-azulada das feridas operatórias estava relacionada a um pior prognóstico do pós-operatório. Um pigmento, a piocianina, foi extraído em 1860, por Fordos, sendo associado a microrganismos em forma de bastonete em 1862, por PITT (1998). Apenas em 1882, GESSARD conseguiu obter este microrganismo em cultura pura, que foi chamado de *Bacillus pyocyaneus* (SKERMAN, 1980). Os termos “*pyocyaneum*” e “*aeruginosa*” se referem à característica da coloração azul esverdeada formada pelas culturas devido à produção de piocianinas.

*P. aeruginosa* são bacilos gram negativos retos ou ligeiramente curvos, podendo ser observadas como células isoladas, aos pares, ou em curtas cadeias; é intensa ou suavemente curvado, mede 1,5 a 3  $\mu$  de comprimento e 0,5 - 0,8  $\mu$  de largura, motilidade por meio flagelo polar e apresentam multiplicação favorável sem muita exigência nutricional, sobrevivendo em água destilada, com grande proliferação em meios de cultura não

necessitando de fatores orgânicos de crescimento. Desenvolve - se bem entre 37 e 42°C e não tolera pH ácido (POLLACK, 2000).

Microrganismo com estrutura externa apresenta características gerais dos Gram negativos: estrutura multilaminar composta de membrana externa, seguida de espaço periplasmático que inclui uma fina camada de peptidoglicano na parede celular, e internamente, a membrana citoplasmática. Envolvendo tudo isso, encontra - se uma cápsula ou camada mucóide (POLLACK, 2000). A membrana externa é uma estrutura bi laminar, cujo folheto externo, hidrofílico, é composto por moléculas de lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é considerado o principal determinante sorológico de muitas bactérias Gram - negativas (VOLK *et al.*, 1991). Ou seja, *P. aeruginosa* é sorologicamente heterogênea, e o LPS determina o tipo de antígeno determinante dessa variabilidade.

*P. aeruginosa*, em cultura pode exibir múltiplos tipos de colônias. Um exemplo é a forma mucóide que ocorre devido à produção de grandes quantidades de alginato, polissacarídeo capsular que permite à bactéria infectante aderir às superfícies epiteliais pulmonares e formar biofilme, os quais protegem a bactéria contra os antibióticos e o sistema imunológico do organismo.

A grande maioria das amostras de *P. aeruginosa* pode ser identificada nos meios de cultura comuns devido às características morfológicas das colônias e à produção difusa de pigmentos (GILARDI, 1980). Pode ser identificada bioquimicamente através de reações positivas para oxidase, indofenol, arginina - hidrolase, utilização de citrato, oxidação da glicose e xilose.

Esta bactéria, além de invasiva, é toxinogênica. Produz um grande número de produtos extracelulares (elastases, proteases) que, assim como a suas estruturas externas e componentes da superfície celular, estão envolvidos na patogênese das infecções. Dois pontos devem ser comentados: Colonização e a Invasão.

Na colonização por *P. aeruginosa* pode ocorrer em uma variedade de tecidos. Dois fatores de adesão foram identificados: a fimbria (*pilus*) e a cápsula mucóide (alginato). As fimbrias (*pili*) são apêndices superficiais, mais finos e menores que o flagelo, que permitem a aderência do microrganismo aos receptores do gangliosídeo GM 1 presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro. A cápsula mucóide possibilita aderência à superfície mucosa normal, através da interação do alginato com material mucóide similar que recobre a superfície mucosa (DOIG *et al.*, 1988). A substância mucóide é um exopolissacarídeo, constituído por um polímero acetilado, do qual fazem parte os ácido  $\beta$ -D-manurônico e glucurônico unidos por ligação  $\beta$ -1,4, a qual atua na adesão e proteção contra

fagocitose, ação surfactante pulmonar e antibiótico. Além da formação de micro-colônias fortemente aderidas e recobertas por alginato, LPS e proteínas (biofilme).

Na invasão ocorre a produção de elastases que degradam as imunoglobulinas e os componentes do complemento eliminando atividade dos neutrófilos, exotoxina A que é responsável pela destruição tecidual, inibição síntese protéica, interrompendo atividade celular e a resposta macrofágica, lipase, fosfolipase C que destroem a membrana citoplasmática e surfactante pulmonar.

### **1.1.2 Epidemiologia das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa***

Estando presente no solo e água, os BGNNF raramente causam infecções comunitárias, apesar ser encontrada na microbiota intestinal de 7 a 25%, eles estão relacionados principalmente à infecção hospitalar, onde atuam principalmente como patógeno oportunista causando um grande número de enfermidades como infecção trato urinário, septicemia, pancreatite e infecções pulmonares crônicas (ARTENSTEIN, 1993; GANG *et al.*, 1999; VALENTE *et al.*, 2000; GARAU, 2003; WU *et al.*, 2003).

A maioria das infecções causadas por *P. aeruginosa* podem ser relacionadas à deficiências no sistema de saúde, principalmente as encontradas no ambiente hospitalar. No entanto infecções causadas por esta bactéria adquiridas na comunidade podem variar de leves a graves, sendo geralmente relacionadas a pessoas que não apresentam imunossupressão, que entram em contato com água ou soluções contaminadas (POLLACK, 2000). Dentre as infecções comunitárias, merecem destaque:

Infecções relacionadas ao uso de drogas ilícitas devido à contaminação da água usada como diluente, causando bacteremia e endocardite de valva nativa. (LEVINE *et al.*, 1986).

Infecção superficial do ouvido, principalmente nos indivíduos que praticam esportes aquáticos, conhecida como “otite do nadador” (VAN ASPEREN *et al.*, 1995).

Infecção ocular relacionada ao uso de lente de contato, devido à contaminação da solução que preserva as lentes. Ceratite pode estar relacionada a trauma ocular ou a uso de medicamentos contaminados como colírios (MATTHEWS *et al.*, 1992).

Infecções relacionadas ao uso de piscinas, banheiras de hidromassagem, como infecções cutâneas, otites externas, infecções trato urinário, pneumonias (RATNAM *et al.*, 1986; CRNICH *et al.*, 2003).

Pneumonia comunitária, em pacientes com DPOC ou ICC (HENDERSON *et al.*, 1992). Já foi descrita a relação entre infecção pulmonar crônica e a formação de bronquiectasias, sugerindo-se que a infecção contribuiria no desenvolvimento desta complicação (NAGAKI *et al.*, 1992). Infecção crônica por *P. aeruginosa* esta associada com aumento da morbidade e mortalidade nos pacientes com fibrose cística, pois uma vez que a infecção crônica se estabelece, é muito difícil de erradicá-la, mesmo com terapia antimicrobiana intensa (JONES *et al.*, 2003).

Porém, *P. aeruginosa* é principalmente um patógeno nosocomial; ou seja, tem papel de destaque, pela frequência, custo ou pela morbi-mortalidade relacionada às suas infecções.

No Brasil, não temos disponibilidade de dados oficiais de infecções hospitalares coletados de modo sistemático. A importância deste patógeno nas infecções hospitalares e principalmente, nas pneumonias, é sugerida nos estudos locais, porém com dados disponíveis em resumos de congressos. Segundo o sistema SENTRY (Programa de vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana) foi a causa mais frequente de infecções do trato respiratório (32%), a segunda de infecções urinárias e de ferida cirúrgica (12% cada) no período de 1997 a 2001 (SADER, 1998). Entre 1993 e 1995, em UTI de pacientes oncológicos no Rio de Janeiro, *P. aeruginosa* foi o terceiro agente mais comum em pneumonias (VELASCO *et al.*, 1997). Figueiredo e colaboradores isolaram *P. aeruginosa* em enfermaria e UTI, constataram sua presença na urina (26,7%), secreção traqueal (26,1%), pele (19,8%), ponta de cateter (8,6%), sangue (4%) e outros materiais (14,8%). (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

As infecções estão entre as maiores causas de óbitos em pacientes internados em UTI, sendo as de origem respiratória as mais prevalentes, correspondendo a 50 % das infecções nosocomiais em pacientes criticamente enfermos (VINCENT *et al.*, 1995; COOK *et al.*, 1998). Nos pacientes em uso contínuo de ventilação mecânica os estudos demonstram aumento do risco desenvolver pneumonia em 21 vezes, sendo a taxa média de 20% ou de 16 a 21 infecções em cada 100 pacientes (COOK *et al.*, 1998). Define-se pneumonia associada ventilação mecânica (PAVM) aquela que surge 48 - 72 horas após intubação orotraqueal e a instituição da ventilação mecânica invasiva (CELIS, 1988).

Dentre os fatores de risco para desenvolvimento de PAVM a secreção que se acumula acima do balonete do tubo e principalmente a presença de um biofilme, com contaminação por bactérias dentro do tubo traqueal, quando da aspiração traqueal ou realização de broncoscopia (ATS, 2005).

De acordo com dados do SENTRY (SADER *et al.*, 2004), *P. aeruginosa* permanece como a bactéria que mais frequentemente causa PAVM além do *Acinetobacter sp.*, *enterobactérias resistentes* e *S. aureus oxacilina resistente*.

Além da alta frequência, infecções por *P. aeruginosa* são motivo de preocupação pelo custo e mortalidade a que estão relacionadas. FAGON *et al.*, (1993) encontraram mortalidade atribuível de 42,8% pacientes que desenvolveram pneumonia associada ventilação mecânica por *P. aeruginosa*. Gomez *et al.*, (2004) mostrou que em 211 casos, entre os anos de 1992 a 1998, ocorreu cerca de 28% mortalidade que estava relacionada à gravidade do quadro inicial e à presença de complicações. Comparando com bacteremias causadas por *S.aureus*, OSMON *et al.*, (2004) observaram que a mortalidade por *P. aeruginosa* foi maior do que aquela por *S. aureus* sensível à oxacilina (30,6% versus 16,2%) ou resistente à oxacilina (13,5%), sendo mais elevada na presença de endocardite.

*P. aeruginosa* mostra uma facilidade peculiar de desenvolver resistência aos antimicrobianos, e a associação da resistência com o aumento de taxas de mortalidade, morbidade e custos é observada.

O espectro clínico das infecções por *P. aeruginosa* pode variar de leve a sepsis grave, dependendo do órgão acometido: infecções relacionadas a dispositivos como pneumonia secundária ao uso de ventilador mecânico, bacteremia associada ao uso de cateter vascular, infecção urinária relacionada ao uso de cateter vesical, infecção operatória, abscesso pulmonar, entre outras. A pneumonia relacionada ao uso de prótese ventilatória, por vezes necrotizante, está entre as infecções hospitalares de maior mortalidade (RELLO *et al.*, 1997). Trabalho realizado por Guerra e colaboradores, em unidade terapia intensiva hospital privado no ano de 2005 demonstrou que a pneumonia associada ventilação mecânica decorrente *P. aeruginosa* resistente ao carbapênicos apresentou taxa de mortalidade 71%.

O modo de transmissão desta bactéria a partir do ambiente para o paciente seria através de líquidos contaminados, por meio de contato direto ou aspiração de seus aerossóis, ou transferência indireta através das mãos que tocaram em superfícies úmidas (SEHULSTER, 2003). Entre as fontes dos surtos relacionados a *P. aeruginosa* citadas anteriormente encontramos: equipamentos de limpeza de ambiente, pias, lavadora automática de endoscópios (SCHELENZ, 2000). Gaze para curativo, endoscópios, broncoscópios (SRINIVASAN *et al.*, 2003). Os profissionais de saúde já foram identificados como fonte dos surtos relacionados ao uso de unha postiça e natural (MOOLENAAR *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*

Um dos mais graves problemas que atingem os hospitais de maior complexidade é a emergência de bacilos Gram-negativos multiresistentes, principalmente *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. Baumannii* e *Enterobacter ssp.*, sendo que o percentual de resistência mais elevado é encontrado nas amostras isoladas de UTI, o que pode ser justificado pelo maior uso de antibióticos neste meio, com transmissão desta cepa entre os pacientes. Em relação à *P. aeruginosa*, o sistema SENTRY mostra que os níveis de resistência são importantes na América Latina e, principalmente, no Brasil, pois além de terem taxas mais altas de resistência em relação a outras regiões do mundo, níveis crescentes têm sido observados. (SADER, 2004). Nos últimos 20 anos, um aumento notável da resistência de bactérias aos antimicrobianos vem sendo relatado, principalmente em áreas de atenção a pacientes graves (FRIDKIN, 1999; BOUZA *et al.*, 2003). Por exemplo, nos EUA, entre os anos de 1998 - 2003, notou - se um aumento de cerca de 12% na resistência de amostras de *S. aureus* e *Enterococcus sp.* a oxacilina e vancomicina respectivamente. Entre as enterobactérias, um aumento de até 47% na resistência às cefalosporinas de terceira geração em amostras de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, observou - se aumento de 9% na resistência às quinolonas e de 15% ao imipenem (NNIS, 2004). Fora do ambiente hospitalar também foi observado a diminuição de sensibilidade ao antimicrobianos. Este fato é preocupante visto que a perda de sensibilidade em curto espaço de tempo não é correspondida à velocidade em que novos antimicrobianos podem ser lançados no mercado (D' AGATA, 2004).

Dentre os países da América Latina, a resistência parece ser mais acentuada no Brasil, conforme sugerida por Andrade e colaboradores (ANDRADE *et al.*, 2003). Conforme estes autores amostras isoladas no período de 1997 - 2001, tendo observado 90% das amostras com resistência simultânea a várias classes de antimicrobianos eram procedentes do Brasil. Este perfil de multirresistência (MR) aumentou, em média, em 5,4% ao ano, neste período.

Gales e colaboradores (GALES *et al.*, 2003) chamaram a atenção para a similaridade e disseminação de amostras de *P. aeruginosa* com resistência a vários antimicrobianos, incluindo carbapenens, distribuídas por 12 hospitais de diferentes estados brasileiros. Estudo realizado por Figueiredo e colaboradores (FIGUEIREDO, 2007) na cidade do Recife em dois hospitais públicos evidenciou taxas de resistência antimicrobiana da *Pseudomonas aeruginosa* similares ao estudo de Kliffer *et al.* (2003) que compilou cepas de 21 hospitais de várias regiões do Brasil sendo mais elevada do que as descritas em outros

países. Revelou elevada prevalência de multi resistência, com 49,7% das cepas resistentes a três ou mais antibióticos e 28% das cepas resistentes a seis ou mais antibióticos.

Os mecanismos que explicam essa resistência são as características intrínsecas da *P. aeruginosa* e a resistência adquirida no qual o antibiótico deixa de ser ativo devido mutações ou da aquisição de novos genes que levem à resistência adquirida. As características intrínsecas: produção de  $\beta$ -lactamase induzíveis do tipo AmpC, que conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos como cefalotina e ampicilina; os sistemas de efluxo, que removem  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrolídeos e ainda corantes e detergentes; ausência de porinas de alta permeabilidade, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, baixa permeabilidade da membrana externa e sua disposição em forma de biofilme bacteriano.

#### 1.1.4 Biofilme bacteriano

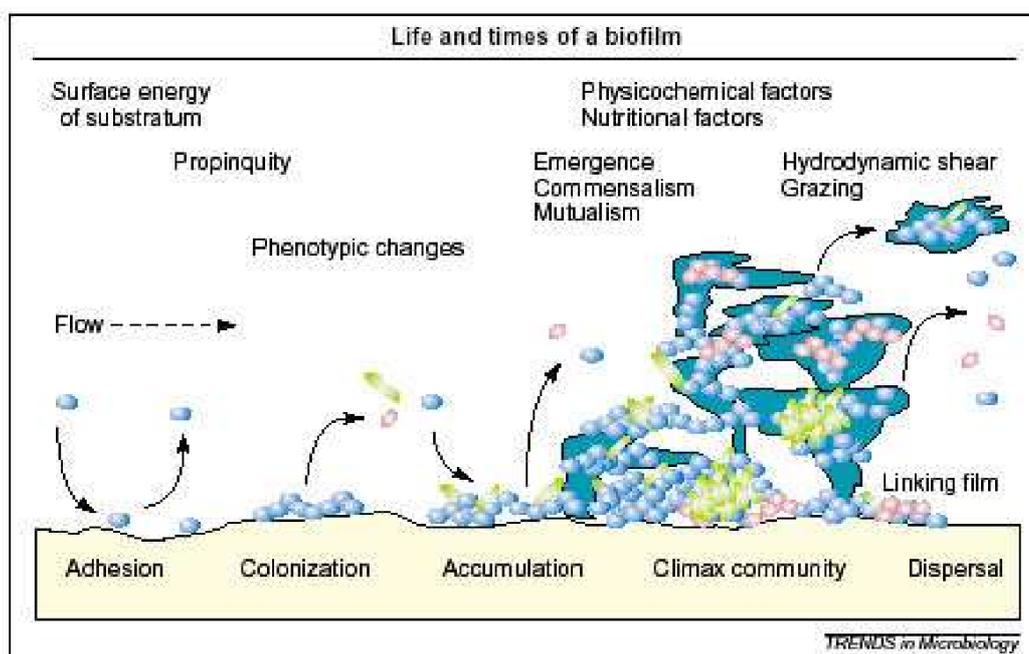
Biofilme tem sido descrito em vários sistemas desde a descrição de Van Leeuwenhoek no século XVII. Aparentemente 99,9 % das bactérias do ecossistema aquático natural crescem na forma de biofilme. Esta predominância de biofilme foi estabelecida em todos ecossistemas naturais, exceto em águas profundas (COSTERTON, 1995).

Marshall (1976) demonstrou envolvimento de finas fibras de polímero extracelular no qual se ancoravam as bactérias na sua superfície. Costerton *et al.* (1978) observaram que comunidades de bactérias unidas no sistema aquático são encontradas envoltas em glicocalix, matriz que se demonstrou ser um polissacarídeo.

Biofilmes são agregados de microorganismos nas interfaces sólidos / líquido ou sólido/ar, onde as células estão imersas em matriz de substância polimérica extracelular (EPS), composta por polissacarídeos e proteínas (WINGENDER, 1999). Exopolissacarídeos são considerados componentes fundamentais na determinação da estrutura e integridade funcional do biofilme microbiano, pela formação gel tridimensional altamente hidratado onde os microorganismos estão aderidos. Além disso, a ligação das células do biofilme (coesão) e o ancoramento do biofilme no substrato (adesão) são realizados pelos exopolissacarídeos (Figura 1, pág 23).

A nova definição descreve o biofilme como uma microbiota derivada de comunidade sésil caracterizado por células que são irreversivelmente aderidas a um substrato ou interface e são embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares as quais elas produzem e exibe um fenótipo alterado com respectiva taxa de

crescimento e transcrição genética (COSTERTON, 2002). Esta definição pode ser útil, porque algumas populações bacterianas que preenchem os critérios para ser denominados biofilme, os quais envolvem formação matriz e crescimento em uma superfície, não assumem o fenótipo de biofilme. Essas populações não biofilmes, incluem colônias de bactéria que crescem em superfície de Agar, possuem células planctônicas que se ancoram na superfície e não exibem nenhuma característica de resistência de um biofilme verdadeiro. Podendo ser relatado que células biofilme as quais estavam contidas na matriz e que se separam circulando nos fluidos corporais possuem as mesmas características de resistência de sua comunidade geradora (COSTERTON, 2002).



**Figura 1** - Diagrama de formação de biofilme adaptado de Stoodley et al., 2002.

O estudo da aderência celular com biofilme *P.aeruginosa* foi historicamente focado na produção de alginato (NIVENS *et al.*, 2001). Costerton e Lappin-Scott (1995) observaram que a adesão desencadeia expressão de genes que controlam produção de componentes bacterianos necessário para adesão e formação biofilme, enfatizando que este processo formação foi regulado por genes específicos transcritos durante aderência celular inicial. Por exemplo, no estudo da *P. aeruginosa*, foi demonstrado que o gene (*alg C*) controla a fostomanomutase envolvido na síntese do alginato exopolissacarídeo e que os genes *alg D*, *alg U*, *rpoS*, controlam a síntese de polifosfoquinase (DAVIES; GEESSEY, 1995).

A formação dos biofilmes por *P. aeruginosa* nos tecidos infectados foi demonstrada como responsável pela resistência inerente das bactérias por certos antibióticos

(STEWART, 2001). A capacidade da lectina em mediar a interação célula-célula em uma determinada população bacteriana pode estar envolvida no desenvolvimento e manutenção dos biofilmes, determinando a habilidade da *P. aeruginosa* em colonizar superfícies bióticas e abióticas (IMBERTY *et al.*, 2004).

Integridade do biofilme depende integridade estrutural da natureza matriz extracelular e sua composição. (BRANDA *et al.*, 2005). Na *P. aeruginosa* pensou-se durante muito tempo que o alginato poderia ser maior constituinte da matriz, mas classes biofilmes não mucóide são formados com pouco ou nenhum alginato (WOZNIAK *et al.*, 2003; BRANDA *et al.*, 2005). Recentemente 2 polímeros de carboidrato foram identificados na matriz *P. aeruginosa*, envolvidos no desenvolvimento do biofilme. Eles são polímeros ricos em glicose (FRIEDMAN; KOLTER, 2004) e rica em manose (MATSUKAWA; GREENBERG, 2004). Além disso, tem sido demonstrado que a morte das células bacterianas com lise e liberação do DNA tem papel importante no desenvolvimento do biofilme (WEBB *et al.*, 2003). Múltiplos fatores de superfície estão envolvidos a cada estágio de desenvolvimento biofilme *P. aeruginosa* e incluem produção de alginato (NIVENS *et al.*, 2001), flagelo e pili tipo IV (O' TOOLE; KOLTER, 1998).

Desenvolvimento do biofilme é controlado por um número de vias regulatórias incluem quorum sensing (DE KIEVIT *et al.*, 2001) repressão de catabólitos (O' TOOLE *et al.*, 2000) e expressão de genes da fase estacionária (HEYDORN *et al.*, 2002).

A natureza da estrutura biofilme e atributos fisiológicos dos organismos do biofilme conferem uma resistência inerente aos agentes antimicrobianos, mesmo se os agentes forem antibióticos, desinfetantes ou germicidas. Os mecanismos responsáveis por essa resistência podem ser um ou mais dos seguintes: 1) atraso na penetração do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme. 2) alteração na taxa crescimento dos organismos do biofilme e 3) outras mudanças fisiológicas devido ao modelo crescimento biofilme.

**1 - Atraso na penetração agente antimicrobianos** - as substâncias poliméricas extracelulares constituintes presentes da matriz representam uma barreira difusional para essas moléculas influenciando na taxa de transporte dessa molécula para o interior do biofilme ou reação do material antimicrobiano com o material da matriz. Suci e cols. (SUCI *et al.*, 1994) demonstraram um atraso na penetração da ciprofloxacina no biofilme *P. aeruginosa*, o qual normalmente necessita de 40 segundos para esterilizar uma superfície demorou cerca de 21 minutos para uma superfície contendo biofilme. Hoyle (1992)

encontrou que células bacterianas dispersas são 15 vezes mais susceptíveis a tobramicina que células em biofilmes intactos.

Hatch e Schiller (HATCH *et al.*, 1998) demonstraram que suspensão de alginato 2% isolado da *P. aeruginosa* inibiu a difusão da gentamicina e tobramicina e seu efeito foi inverso pelo uso de alginato liase. Nem todos agentes antimicrobianos são afetados de forma igual, glicopeptídeos como vancomicina e teicoplanina são significativamente afetados, entretanto agentes como rifampicina, clindamicina e os macrolídeos são minimamente afetados ou não são afetados. Outros estudos (GORDON *et al.*, 1988) examinaram a difusão de diversos agentes antimicrobianos (ceftazidima, piperacilina, gentamicina e tobramicina) através de gel alginato naturais ou sintéticos e encontrou que os antibióticos  $\beta$  lactâmicos difundem na matriz mais rapidamente que os aminoglicosídeos.

**2 - Alteração na taxa crescimento organismo biofilme** - células associadas ao biofilme crescem significativamente mais lentas que células na forma planctônica, como resultado a captação agente antimicrobianos é mais lenta. Anwar e cols. (ANWAR *et al.*, 1992) encontraram que biofilmes de *P. aeruginosa* com 10 dias de idade são significativamente mais resistentes a tobramicina e piperacilina que biofilme de células jovens (02 dias). Contagem células do biofilme mais velho foi reduzida apenas 20% pela exposição da dose. Resultados similares têm sido observados com diversas combinações de bactérias e agentes antimicrobianos (CHUARD *et al.*, 1993; DESAI *et al.*, 1998; AMORENA *et al.*, 1999).

**3 - Outras mudanças fisiológicas devido ao modelo de crescimento do biofilme** - bactérias Gram negativas respondem a limitação nutrientes e outros stress do meio ambiente pela síntese de fatores sigma. Em *E. coli*, esses fatores sigma estão sob controle do rpoS regulon, o qual regula a transcrição de genes que produz diminuição do efeitos stress.

Desta forma, o desenvolvimento de drogas que inibam ou previnam a formação de biofilmes tem futuro promissor (STEWART e COSTERTON, 2001). Os mecanismos responsáveis pela formação biofilme tem sido alvo de estudos recentes, diversas proteínas estão sendo identificadas na formação e desenvolvimento dos biofilmes (KLAUSEN *et al.*, 2003). Por exemplo, a utilização de canos de distribuição de água colonizados com biofilme de *P. aeruginosa* produtor de galactosidase não metabolizada podem ser alternativa para a remoção e prevenção de acúmulo de biofilmes.

## 1.1.5 LECTINAS

### 1.1.5.1 Definição

A hemaglutinação de eritrócitos em extratos de plantas, mediada por proteínas, foi primeiramente identificada por Stillmark em 1888, pesquisando fatores de toxicidade em *Ricinus communis* (BARONDES, 1988). Ele mostrou que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína que chamou de ricina, embora agora esteja evidente que o que ele chamou de ricina era uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não tóxicas. Outro pioneiro no estudo de lectinas foi o pesquisador Karl Landsteiner que iniciou novos estudos utilizando aglutininas vegetais como ferramentas para o descobrimento dos grupos sanguíneos A, B e O (LANDSTEINER; RAUBITSCHKE, 1907). O termo “Lectinologia”, uma expressão introduzida por Potapov (1968), surgiu para designar uma área de estudos inteiramente voltada à pesquisa sobre uma classe especial de proteínas denominadas lectinas.

A primeira definição de lectinas foi proposta por Boyd e Shapleigh (1954). Estes autores utilizaram o termo lectina (do latim, *legere* - capaz de escolher, selecionar para lembrar o aspecto seletivo de ligação de certas proteínas de sementes a eritrócitos humanos). Eles demonstraram essa seletividade em 1954 quando verificaram que extratos de sementes de *Phaseolus vulgaris* aglutinavam eritrócitos de apenas alguns indivíduos. Peumans *et al.* (1998) definiu lectinas como proteínas com no mínimo um domínio não catalítico que ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Esta interação é mediada por ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals (WEIS *et al.*, 1996).

Algumas lectinas podem ter um segundo tipo de sítio de ligação que interage com um sítio não carboidrático. Pois, algumas enzimas de plantas são compostas de um sítio de ligação a carboidrato e um sítio catalítico, que atuam independentemente (COLLINGE *et al.*, 1993). Várias proteínas ligantes de carboidrato possuem somente um sítio de ligação não sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; diversas espécies de legumes contêm proteínas que estão relacionadas com as lectinas e são destituídas de atividade de ligação a carboidrato (PEUMANS *et al.*, 1995).

De acordo com Peumans e Van Damme (1995) as lectinas foram subdivididas em quatro classes principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (figura 2, pág. 27).

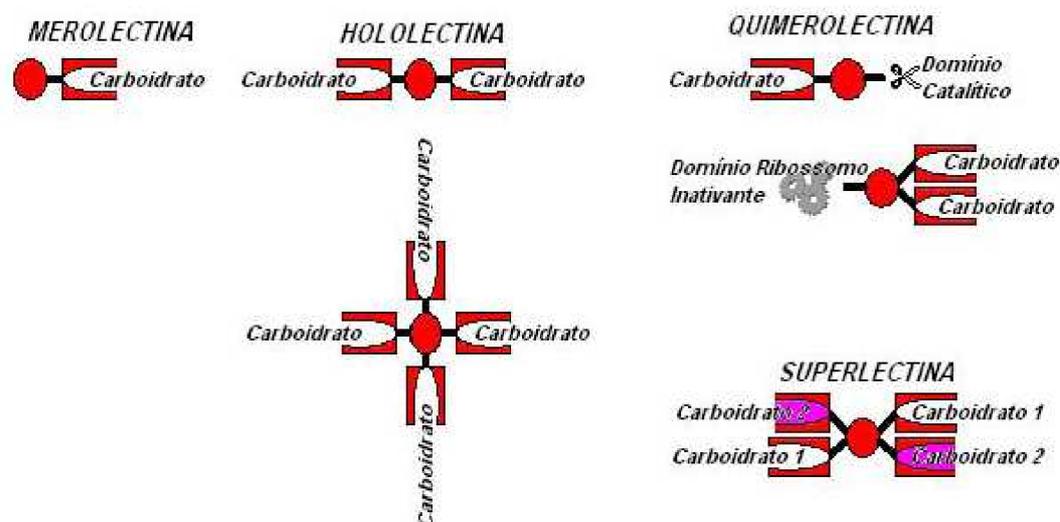
Merolectinas: proteínas que consistem exclusivamente de um único domínio de ligação a carboidrato. Devido seu caráter monovalente as merolectinas são incapazes de

precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*) que se liga à quitina, é uma típica merolectina (VAN PARIJIS *et al.*, 1991).

Hololectinas: compostas exclusivamente de domínios de carboidratos ligantes, mas com dois ou mais sítios ligantes, que são idênticos ou parecidos. Devido as hololectinas serem di ou multivalente elas podem aglutinas células e/ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas comportam – se como verdadeiras aglutininas e compreende a maioria das lectinas de plantas.

Quimerolectinas: fusão das proteínas compostas de um ou mais domínios de carboidratos ligantes e um domínio não relacionado com uma atividade catalítica bem definida e que age independentemente dos domínios de carboidratos ligantes. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam – se como merolectinas ou hololectinas. Um representante deste grupo é a ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidrato comportando – se como uma hololectina e um domínio para inativação do ribossomo (PEUMANS *et al.*, 1998).

Superlectinas: consistem de no mínimo dois domínios de ligação para carboidratos. Diferente das hololectinas os domínios de ligação para carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como a lectina do bulbo tulipa (TxLCI) que são formados por dois domínios de ligação a carboidrato, que reconhecem manose e GalNAac, respectivamente (VAN DAMME *et al.*, 1996).



**Figura 2** - Classificação de lectinas segundo PEUMANS e VAN DAMME (1995) e VAN DAMME *et al.* (1996).

### 1.1.5.2 Ocorrência e atividade biológica de lectinas

Lectinas estão amplamente distribuídas na natureza e centenas destas moléculas têm sido isoladas de plantas, vírus, bactérias, invertebrados e vertebrados, incluindo mamíferos. Apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos, desempenhando papéis biológicos em muitos processos celulares, tais como comunicação celular, defesa de hospedeiros, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária e metástase tumoral (GABIUS; GABIUS, 1997; DEL SOL *et al.*, 2006).

Numerosas bactérias produzem lectinas de superfície comumente fazendo parte das fimbrias. As várias lectinas de bactérias parecem funcionar nas etapas iniciais das infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais do trato urinário e gastrointestinal. As lectinas de bactérias também podem agir como moléculas de reconhecimento em fagocitose de bactérias em ausências de opsoninas por macrófagos de camundongos, de ratos, macrófagos peritoneais, linfócitos e polimorfonucleares humanos (SHARON, 1987). Muitas enterobactérias, como *E. coli* e *Salmonellae spp.*, possuem lectinas na sua superfície, fazendo parte das fimbrias. *P. aeruginosa* produz 02 lectinas chamadas de Lec A (PA – IL) e Lec B (PA IIL) (GILBOA-GARBER, 1972).

Lec A é uma proteína tetramérica consiste de 04 subunidades 12,75 KDa é conhecida como ligante D - galactose e seus derivados. Garber e colaboradores (1991) demonstraram que Lec A se liga derivados hidrofóbicos de thiogalactose e galactose melhor do que propriamente a D - galactose. Lec A foi reportada se localizar principalmente no citoplasma da célula e apenas uma pequena fração estaria presente na superfície celular (GLICK; GARBER, 1983). Lec A demonstrava efeitos citotóxicos nas células do epitélio respiratório pela diminuição na sua taxa de crescimento, contribuindo com injúria do epitélio respiratório durante infecção por *P.aeruginosa* (BAJOLETLAUDINAT *et al.*, 1994). Em adição, foi demonstrado que Lec A induz aumento na absorção da exotoxina A, um importante fator de virulência extracelular (LAUGHLIN *et al.*, 2000).

Lec B exibe uma alta especificidade para L-fucose e seus derivados e uma baixa afinidade para D-manose (GLICK; GARBER, 1983), diminuindo *in vitro* a frequência do batimento ciliar do epitélio respiratório (ADAM *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm sugerido que ambas lectinas determinam a virulência da *P.aeruginosa*, indicando que a fração expressa na superfície celular é altamente significativa. Lec A promove adesão da bactéria a células da córnea de coelho (WENTWORTH *et al.*, 1991) e efeito citotóxico para linfócitos periféricos humanos (SHARABI; GILBOA-

GARBER, 1979) e células do epitélio respiratório (BAJOLETLAUDINAT *et al.*, 1994). Tem sido demonstrado que Lec A não apenas auxilia na adesão *P. aeruginosa* a células epiteliais intestinais na sepse derivada do intestino, mas também induz defeito de permeabilidade, permitindo que exoprodutos citotóxicos, incluindo exotoxina A, cruzem a barreira epitelial (LAUGHLIN *et al.*, 2000).

Intrigantemente a expressão do gene Lec A pode ser induzida pelo hospedeiro devido ao estímulo para produção de interferon gama, sugerindo que um patógeno oportunista como *P. aeruginosa* pode alterar a função imune do hospedeiro e ajustar seu fenótipo de virulência (WU *et al.*, 2003). Além disso, como uma adesina para células eucarióticas, lectinas purificadas de *P. aeruginosa* podem também aumentar a agregação celular (GILBOA - GARBER, 1972).

Durante infecção, *P. aeruginosa* pode ser protegida das defesas do hospedeiro pela adesão. Parece que a natureza multivalente de Lec A é muito conveniente a ligação de diversas células. Possivelmente por uma via derivada de galactose que está presente nos lipopolisacarídeos (LPS) da *P. aeruginosa*. De fato, preparados de Lec A purificados sempre contêm traços de LPS (GILBOA - GARBER, 1972).

Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na citotoxicidade em células epiteliais do cólon, atuando na etapa de aderência à célula hospedeira, possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, distinto da função de aderência (SAFFER; PETRI, 1991). A seqüência de aminoácidos desta lectina, determinada na sua totalidade, apresentou um total de 1.209 aminoácidos, possuindo 16 sítios de glicosilação e uma região hidrofóbica de 28 aminoácidos ((PINTO -da- SILVA *et al.*, 2002).

Em vírus, a lectina parece estar envolvida no processo de adesão à célula hospedeira. A infecção pelo vírus da influenza é iniciada pelo evento de adesão, mediada por uma lectina da capa do vírion que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991).

Lectinas ocorrem também em fungos *Rhizoctonia solani* (KELLENS; PEUMANS, 1991) e *Pholiota aurivella* (KAWAGISHI *et al.*, 1991).

Em algas marinhas, o número de trabalhos envolvendo lectinas é ainda pequeno, porém tem crescido bastante nos últimos anos. A primeira lectina de alga marinha a ser purificada e caracterizada parcialmente foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977; ROGERS; BLUNDEN, 1980). As algas vermelhas, Classe Rhodophyceae, são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante e também o maior

número de lectinas isoladas (AINOUZ *et al.*, 1995; SAMPAIO *et al.*, 1999; NAGANO *et al.*, 2002; MORI *et al.* 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2006; seguidas das verdes, Classe Chlorophyceae (ROGERS *et al.*, 1986; SAMPAIO *et al.* 1998; BENEVIDES *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2004; ICHIHARA *et al.* 2009) enquanto que apenas uma aglutinina (mucopolisacarídeo) de alga parda foi isolada e caracterizada (aglutinina de *Fucus vesiculosus*)( FERREIROS; CRIADO, 1983).

Em geral as lectinas de algas marinhas apresentam valores mais baixos de peso molecular, variando de 4,2 kDa para as isolectinas de *H. japonica* (HORI *et al.*, 1986) até 60 kDa para uma lectina de *Enteromorpha prolifera* (AMBROSIO *et al.*, 2003). De uma maneira geral, a atividade hemaglutinante das lectinas de algas marinhas não é dependente da adição de cátions divalentes e não costumam ser inibidas por açúcares simples. As lectinas de algas marinhas apresentam, geralmente, alto teor de aminoácidos ácidos, baixas concentrações de aminoácidos básicos e ausência de aminoácidos sulfurados (SAMPALIO, 1992, 1997; CALVETE *et al* 2000).

A atividade biológica de lectinas de algas marinhas vem sendo testada em diferentes sistemas celulares. Recentemente, PINTO *et al.* (2009) demonstraram que lectinas de *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Bryothamnion triquetrum* (BTL) foram capazes de diferenciar linhagens de células de câncer de cólon humano.

Em seres humanos após a descrição de NOWELL (1960) sobre a atividade mitogênica de lectinas sobre linfócitos humanos do sangue periférico, estudando a lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* PHA) novo e importante ramo de pesquisa surgia tanto para a lectinologia quanto para a imunologia. A determinação da mitogenicidade de lectinas se realiza através de ensaios onde suspensões celulares são incubadas com lectinas em várias concentrações diferentes, determinando-se o aumento de incorporação de timidina triciada no DNA após 48 a 72 horas.

Esta descoberta desencadeou um grande número de pesquisas nas quais lectinas vegetais, que apresentavam especificidade a diferentes tipos de carboidratos, foram utilizadas frente a diversos sistemas celulares a fim de estudar sua ação biológica (BARRAL - NETO *et al.*, 1992; BENTO *et al.*, 1993; BARRAL-NETO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2001, CAVADA *et al.*, 2001). Pouco tempo após a descoberta de NOWELL, AUB *et al.* (1965) relataram que a lectina de trigo (WGA) era capaz de distinguir células normais de outras malignas dentro de um mesmo tecido, através da aglutinação específica das células transformadas.

Entre muitas atividades biológicas de lectinas já descritas podemos exemplificar algumas tais como: indução da produção de óxido nítrico (NO) *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 1999); indução de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (ALENCAR *et al.*, 1999); indução de liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994). Trabalho recente de revisão enfoca em detalhes várias atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* de lectinas de leguminosas, correlacionando estas atividades com aspectos estruturais (CAVADA *et al.*, 2001).

### 1.1.5.3 Características gerais das lectinas vegetais

Geralmente, as lectinas estão distribuídas por todas as partes da planta. A maior parte, porém, é encontrada nas sementes. Outras partes das plantas como folhas, caule, raízes e flores, contêm pouca quantidade que não necessariamente são idênticas em estrutura ou especificidade a carboidratos com as lectinas encontradas nas sementes (RUDIGER, 1998). Algumas lectinas são classificadas como metaloproteínas, pois necessitam de cátions  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  para realizar a sua atividade hemaglutinante, sendo que estes íons estão associados a uma série de aminoácidos conservados que participam da ligação ao carboidrato (MURDOCK *et al.*, 2002). Lectinas são geralmente glicosiladas e compostas de 2 ou 4 protômeros ligadas não covalentemente. O peso molecular das lectinas de plantas varia de 8,5 a 265 KDa.

As lectinas consistem de subunidades, cujo número varia entre 1, no caso da lectina de rizomas de *Urtica dioica* (PEUMANS *et al.*, 1984) a 10, no caso de uma das lectinas de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991). No entanto, as lectinas podem apresentar diferentes padrões de associações de suas subunidades dependendo da característica do meio onde se encontram (pH e temperatura) (DEL SOL *et al.*, 2006).

Lectinas distinguem-se de todas as outras proteínas de plantas pela sua capacidade de ligar-se a carboidratos simples ou complexos. Podem ser subdivididas em grupos de acordo com a sua especificidade por carboidratos (Figura 3, pág 32). Há algumas décadas, somente as lectinas ligante de D - manose/glicose, Gal/GalNac, GlcNAc/(GlcNAc), fucose e ácido siálico eram conhecidas (PEUMANS *et al.*, 1998). Um novo grupo de especificidade foi adicionado, o de lectinas de monocotiledôneas ligantes de D - manose (especificidade exclusiva por D - manose). Muitas lectinas não se relacionam neste grupo de especificidade devida não se ligarem a mono ou oligossacarídeos, pois requerem glicanos mais complexos para uma eficiente inibição da sua atividade hemaglutinante (PEUMANS *et*

*al.*, 1998). A especificidade das lectinas é usualmente determinada por ensaios de inibição da aglutinação das células ou da precipitação de glicoproteínas, na qual diferentes carboidratos são utilizados para verificar a sua capacidade de inibir a atividade da lectina. A ligação entre sacarídeos e lectinas pode ser observada por métodos físico-químicos, como equilíbrio de diálise, espectrofotometria, fluorimetria e ressonância magnética (SHARON *et al.*, 1987).

<i>Especificidade</i>	<i>Lectinas</i>
<b>Grupo Fucose</b> Fucose	<i>Ulex europaeus</i>
<b>Grupo Galactose/ N-acetilgalactosamina</b> Galactose>>GalNAc Gal=GalNAc Gal<<GalNAC	Jacalina ( <i>Artocarpus integrifolia</i> ) <i>Clerodendron trichotomum</i> Soja ( <i>Glycine max</i> )
<b>Grupo N-acetilglicosamina</b> GlcNAc (GlcNAc) <sub>n</sub>	Germe de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) <i>Urtica dioica</i>
<b>Grupo Manose</b> Manose Manose/Glicose Manose/Maltose	<i>Galanthus nivalis</i> Con A ( <i>Canavalia ensiformes</i> ) <i>Calystegia sepium</i>
<b>Grupo Ácido Siálico</b> Ácido Siálico Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc Neu5Ac $\alpha$ (2,3)Gal/GalNAc	Germe de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) <i>Sambucus nigra</i> <i>Maackia amurensis</i>
<b>Grupo de Glicanos Complexos</b> Especificidade com complexos conhecidos Especificidade com complexos desconhecidos	PHA ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) <i>Euonymus europaeus</i>

**Figura 3** - Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas vegetais. Adaptada de PEUMANS *et al.* (1998).

As lectinas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares, como as isoformas ou isolectinas. Isto pode ser determinado por pequenas mudanças na sequência de aminoácidos. Um exemplo clássico deste caso é a lectina de sementes de *Datura stramonium*

que é formada pelas subunidades diferentes, A e B com 32 KDa e 28 KDa respectivamente. Podendo ser associadas originando três isoformas com as seguintes estruturas: AA, AB e BB (SHIBUYA *et al.*, 1986).

## 1.2 Diterpeno Casbano

### 1.2.1 Definição

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações constituindo ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação, não somente nos centros urbanos, mas sobretudo nas pequenas comunidades rurais. Este comportamento vem chamando a atenção da comunidade científica no sentido de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (FENNELL *et al.*, 2004). Vale ressaltar que as plantas são fontes naturais de uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas com várias finalidades, entre elas, protegê-las contra predadores ou atrair polinizadores (STEPP, 2004).

Levando em consideração a biodiversidade vegetal que existe no planeta (cerca de 250.000 espécies) e que somente cerca de 5 a 15% foi investigada do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico, as pesquisas com plantas superiores apresentam-se como uma fonte extremamente promissora para a descoberta de novas substâncias que possam ser utilizados no tratamento de várias doenças (ROJAS *et al.*, 2003).

Dentre todas as famílias pertencentes à flora mundial, a família Euphorbiaceae (ordem Euphorbiales), destaca-se por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas, sendo dividida em quatro subfamílias (Phyllanthoideae, Crotonoideae, Porantheroideae e Ricinocarpoideae). Compreende cerca de 300 gêneros, e 5000 espécies de árvores, arbustos, subarbustos, trepadeiras e ervas, distribuídos preferencialmente em áreas tropicais, sendo raras em países frios (GEMTCHÚJNICOV, 1976; QUER, 1980; EVANS; TAYLOR, 1983; WATSON, 1992).

No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies em todos os tipos de vegetação (BARROSO, 1984). Dentre os gêneros nativos do Brasil destacam-se os seguintes: *Croton*, *Phyllanthus*, *Euphorbia* e *Jatropha* (JOLY, 1998). O gênero mais representativo é *Euphorbia* (cerca de 1600 espécies) seguido do gênero *Croton* com cerca de 700 espécies. Estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Croton*, têm mostrado a presença de alcalóides (SANCHEZ *et al.*, 1982) flavonóides (SHETTY *et al.*, 1983), terpenóides

(KHIER ; SALIH, 1979), saponinas (VERA *et al.*, 1990) e taninos (CESPEDES *et al.*, 1992).

O gênero destaca-se por muitas de suas espécies apresentarem uso na medicina popular, dentre as quais, *C. nepetaefolius* (fig. 4) conhecida como “marmeleiro sabiá”, “marmeleiro cravo” ou “marmeleiro de cheiro”, sendo utilizada na medicina popular como estomáquico, carminativo e no tratamento de cólicas intestinais, sendo esta última ação comprovada cientificamente (ABDOM, 2002). Além do fato, dos diterpenos apresentam uma grande variedade de atividades farmacológicas (HANSON, 1996-2006).



**Figura 4 - *Croton nepetaefolius***

SANTOS, H. S Tese de Doutorado - UFC, 2007

Estudos fitoquímicos realizados em espécies de *Croton* têm revelado a existência de metabólitos pertencentes à diversas classes, incluindo: alcalóides, flavonóides, terpenóides e taninos. Dentre estas classes, podemos destacar o isolamento de diterpenos com os mais variados esqueletos (Figura 5, pág. 35).

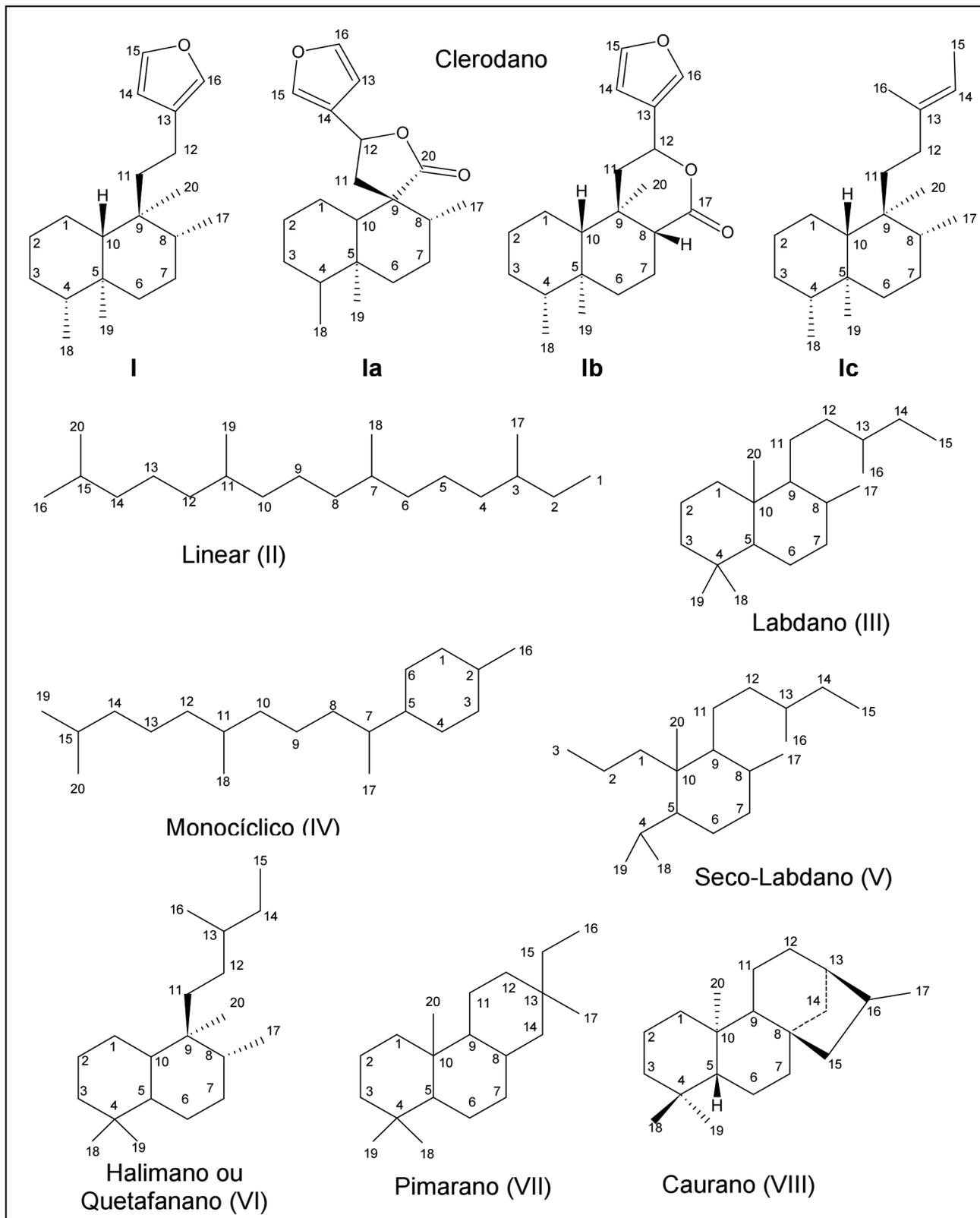
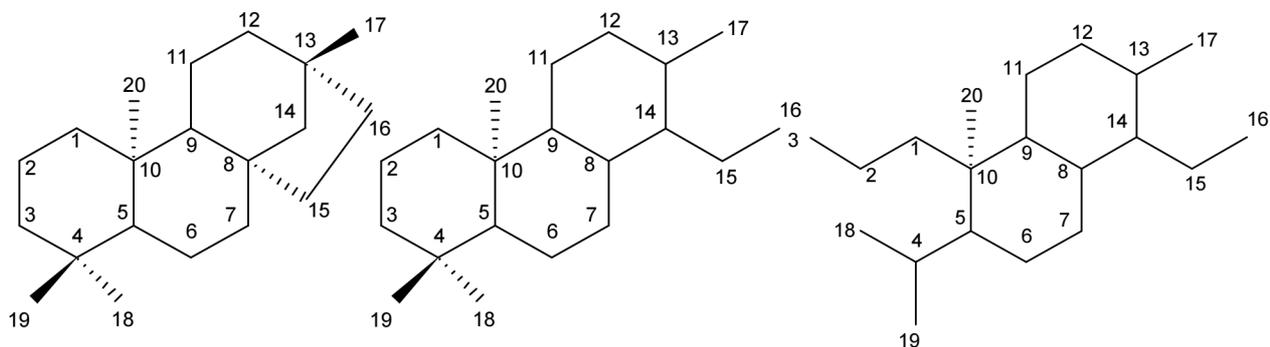


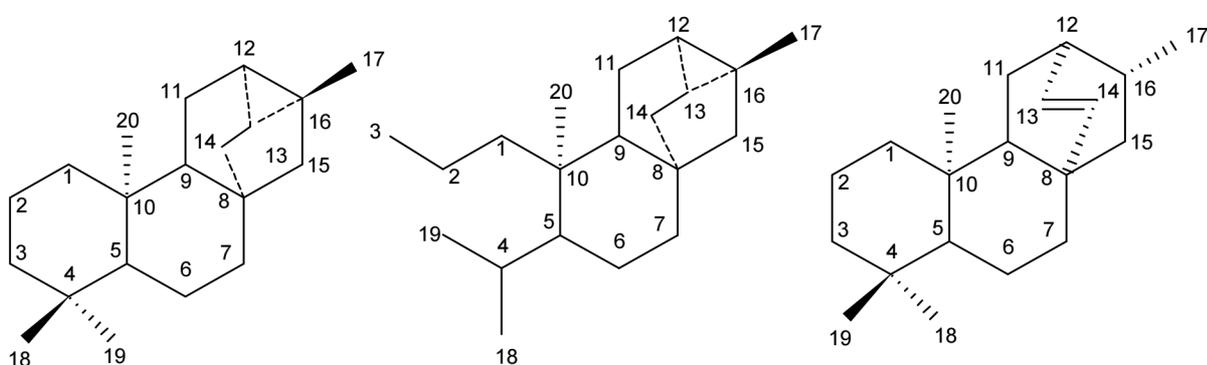
Figura 5 - Esqueletos dos diterpenos isolados de espécies de *Croton*.  
SANTOS, H. S Tese de Doutorado - UFC, 2007



Beierano (IX)

Cleistantano (X)

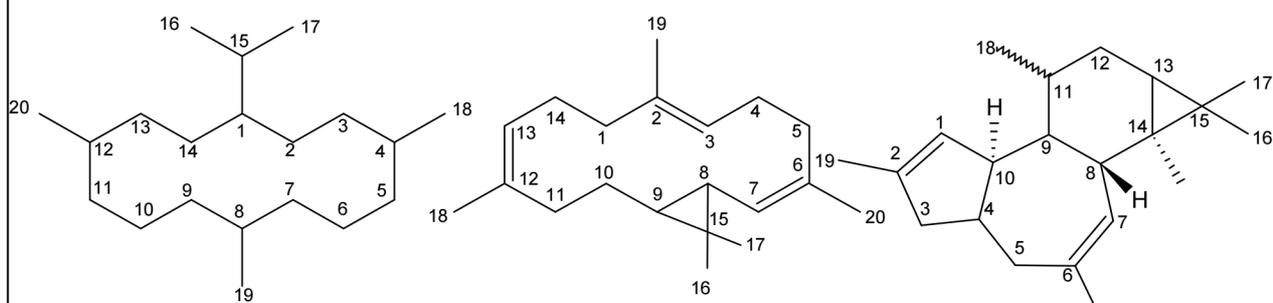
Seco-cleistantano (XI)



Traquilobano (XII)

Seco-traquilobano (XIII)

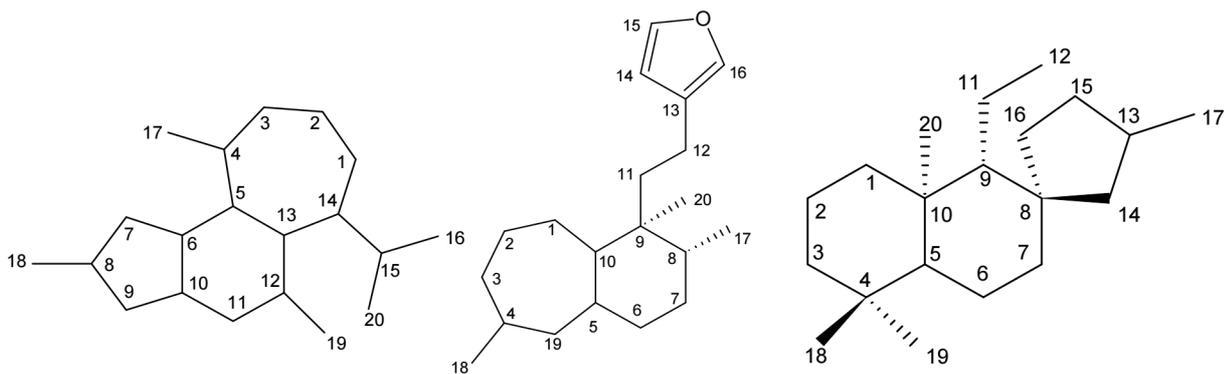
Atisano (XIV)



Cembrano (XV)

Casbano (XVI)

Tigliano (XVII)



Crotofolano (XVIII)

Printziano (XIX)

Sarcopetalano (XX)

Desta maneira, foi realizada uma pesquisa bibliográfica no *science finder*, *web of science* e *sciencedirect* sobre dados de atividades farmacológicas de diterpenos com esqueletos casbano (Figura 6, pág 38) isolados de espécies da família Euphorbiaceae (Tabela 1).

Tabela 1 - Correlação entre as espécies e as atividades farmacológicas de diterpenos casbanos isolados da família Euphorbiaceae relatados na literatura.

<b>Espécie</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Atividade farmacológica</b>	<b>Referência</b>
<i>Croton nepetaefolius</i>	01	-	VERA <i>et al.</i> , 1990
<i>Agrostistachys hookeri</i>	02-04	citotóxica	CHOI <i>et al.</i> , 1988
	05		CHOI <i>et al.</i> , 1986
<i>Croton nitens</i>	06	-	BURKE <i>et al.</i> , 1981
<i>Euphorbia ebracteolata</i>	07-08	bactericida e citotóxica	XU <i>et al.</i> , 1998
<i>Mallotus hookerianus</i>	09-11	-	BAI <i>et al.</i> , 2006
<i>Maprounea</i>	12-13	-	KASHMAN <i>et al.</i> , 1994

SANTOS, H. S **Tese de Doutorado** - UFC, 2007

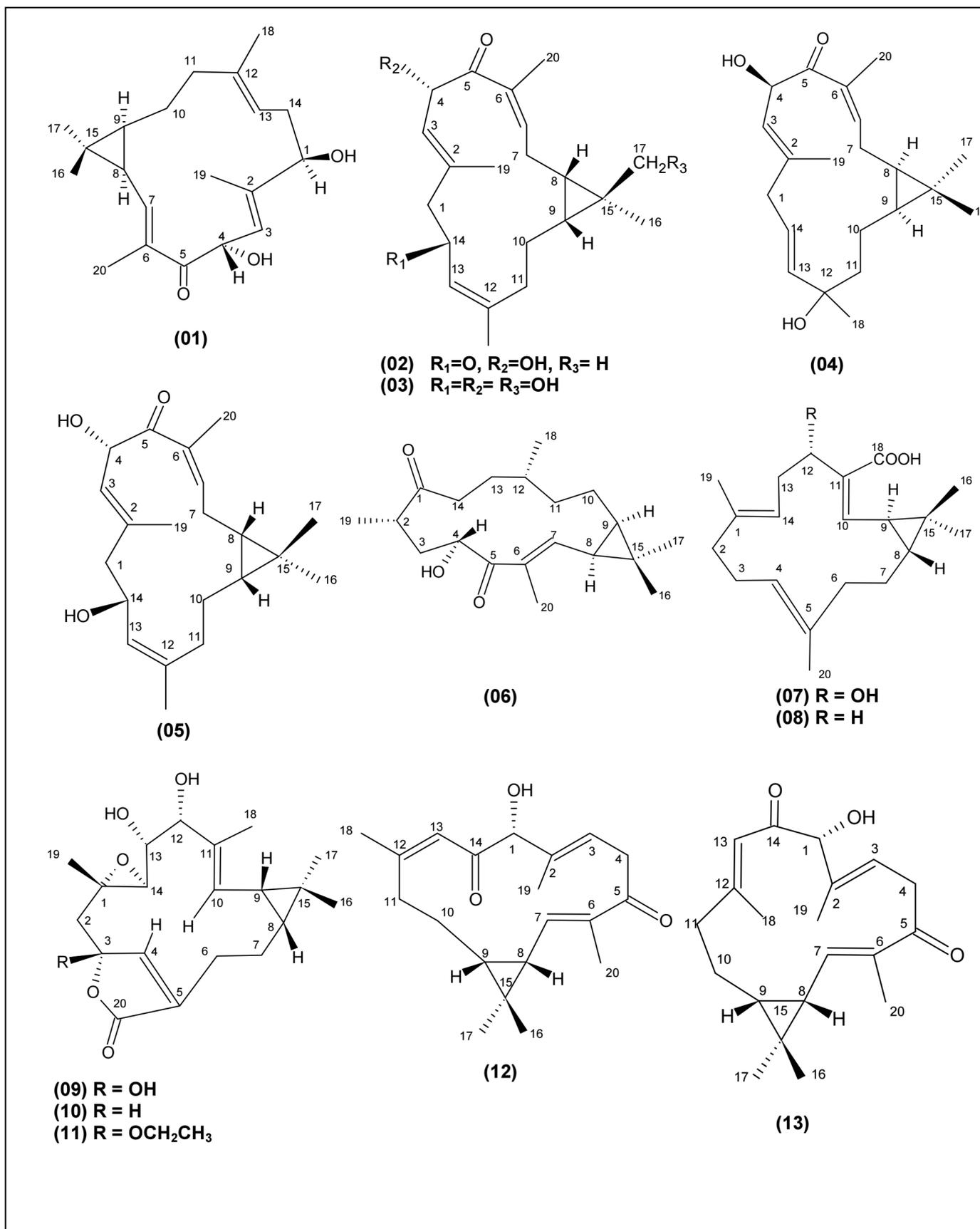


Figura 6 - Estruturas de diterpenos casbeno isolados da família Euphorbiaceae relatados na literatura.

SANTOS, H. S Tese de Doutorado - UFC, 2007

### 1.2.2 Determinação estrutural do diterpeno casbano

O diterpeno casbano (figura 7) foi isolado a partir da fração hexânica do extrato etanólico de *C. nepetaefolius* como óleo denso esverdeado. Por intermédio dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  verificou-se a presença de vinte sinais de carbonos. Esta substância foi isolada anteriormente dessa espécie, sendo identificada como 1,4-dihidroxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona-casbano cujos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IV e massas (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12) estão em acordo com valores da literatura (Tabela 2, pág 40) (Santos *et al.* 2008).

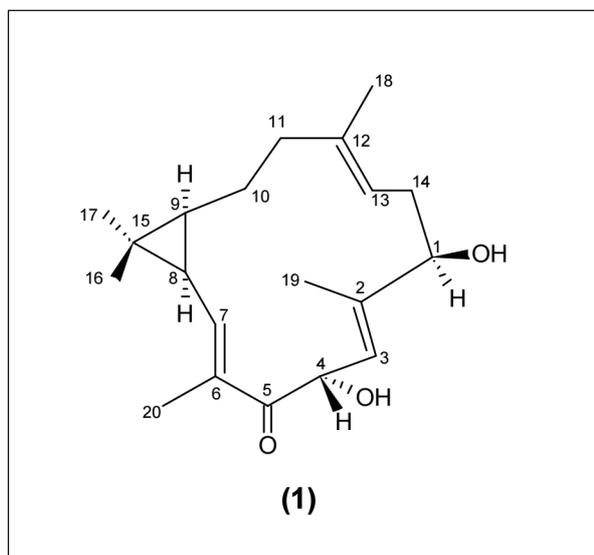


Figura 7 - Diterpeno casbano

SANTOS, H. S *Tese de Doutorado* - UFC, 2007

Tabela 2 - Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de diterpeno casbano em CDCl<sub>3</sub>. Os deslocamentos químicos em  $\delta_C$  e  $\delta_H$  estão em ppm e constantes de acoplamento ( $J$ , entre parênteses) em Hz.

	$\delta_C$	$\delta_H$
1	77,64	4,09 (dd, 9,6, 6,2)
2	144,02	
3	125,48	5,14 (d, 9,4)
4	67,82	5,24 (d, 9,4)
5	199,74	
6	134,61	
7	145,11	6,25 (d, 10,4)
8	28,08	1,50 (dd, 10,4, 8,3)
9	35,67	1,23 - 1,15 (m)
10	25,36	1,23 - 1,15 (m)
		0,79 - 0,72 (m)
11	39,85	2,27 - 2,03 (m)
		1,71 - 1,68 (m)
12	137,39	
13	119,72	4,66 (dd, 6,3)
14	31,66	2,27 (m)
15	27,73	
16	16,12	0,99 (s)
17	29,25	1,13 (s)
18	15,43	1,56 (s)
19	10,15	1,66 (s)
20	12,08	1,90 (s)

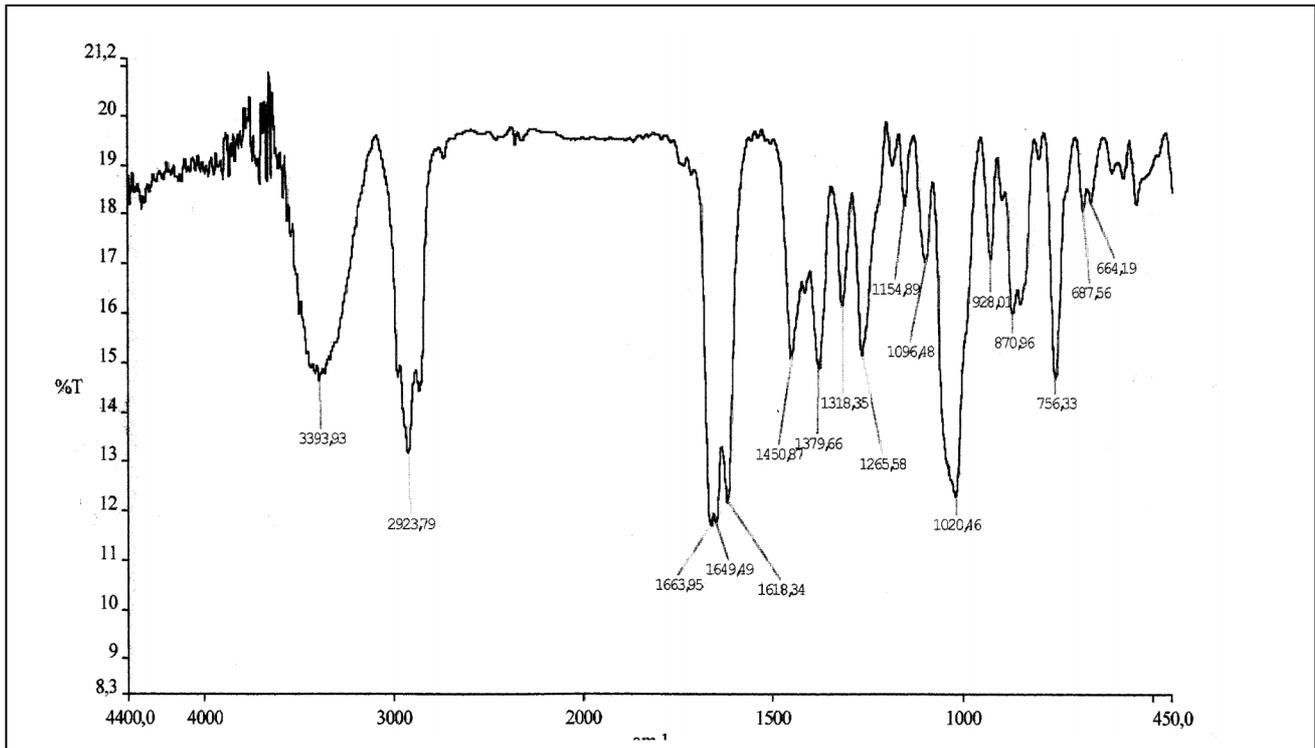


Figura 8 - Espectro na região do IV. de diterpene casbano.

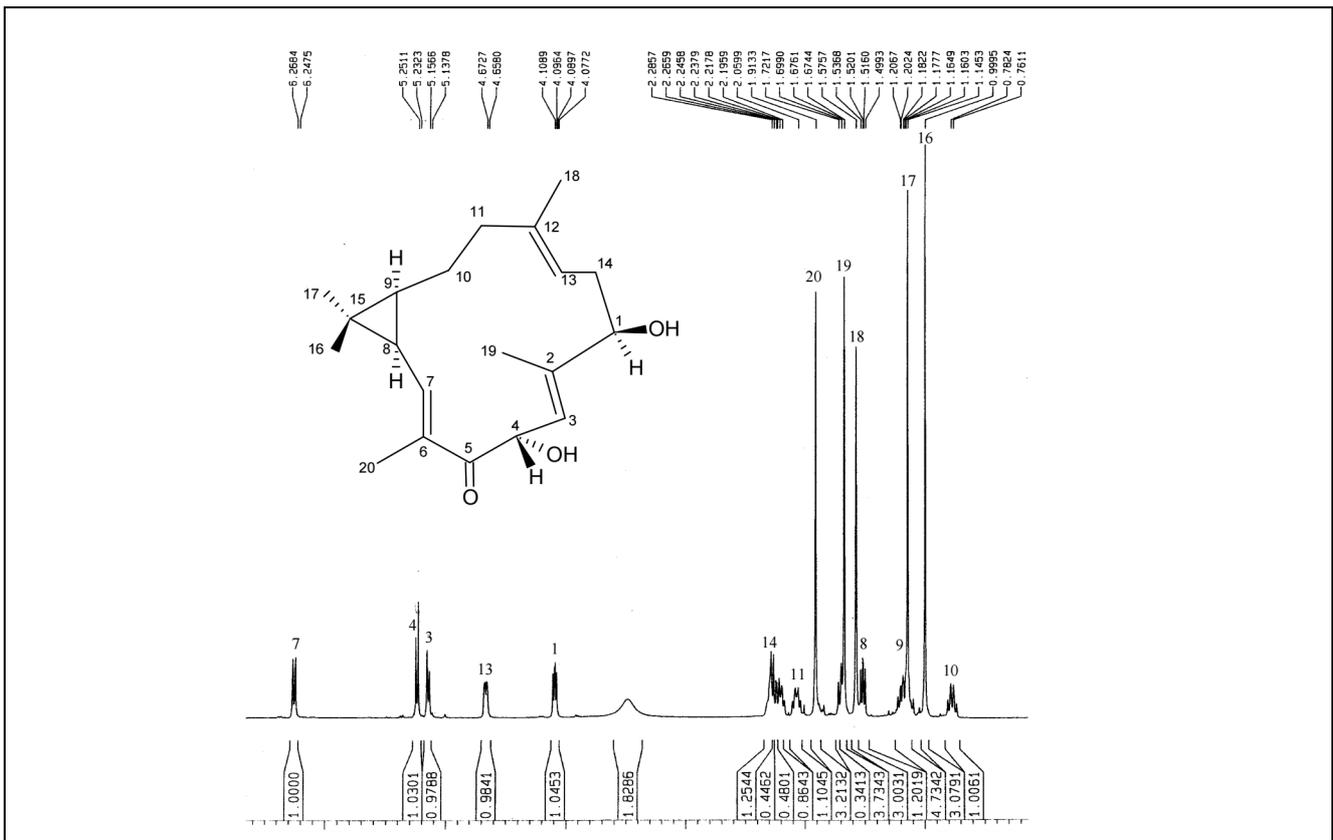


Figura 9 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de diterpene casbano.

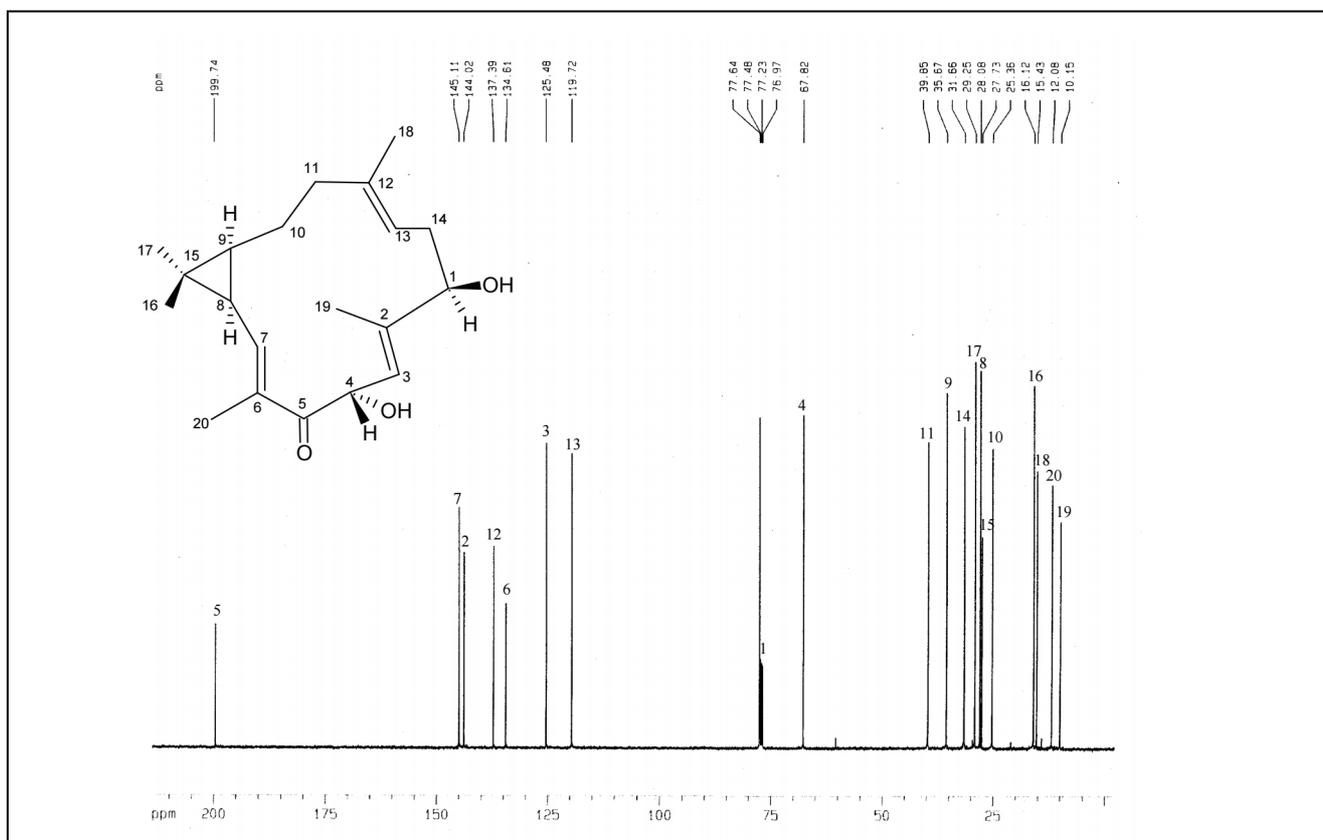


Figura 10 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de THCN-3

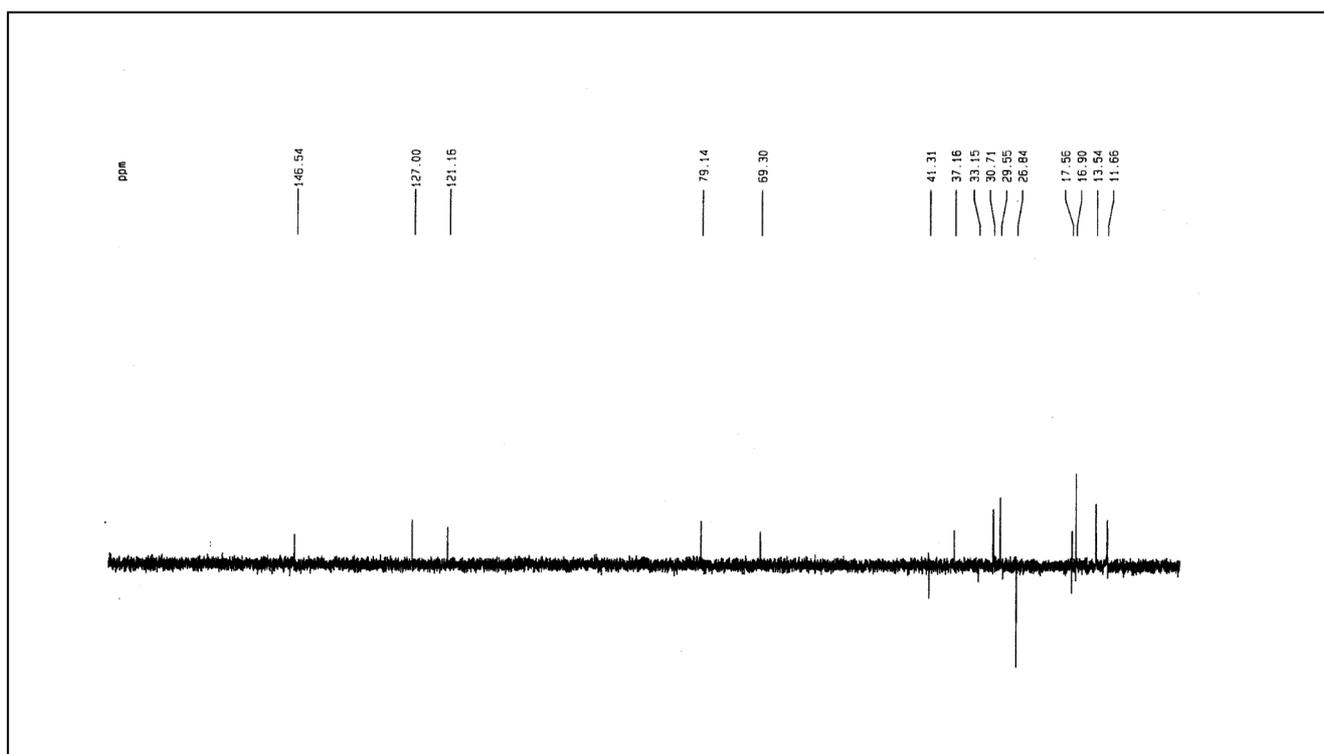


Figura 11 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135° (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de THCN-3.

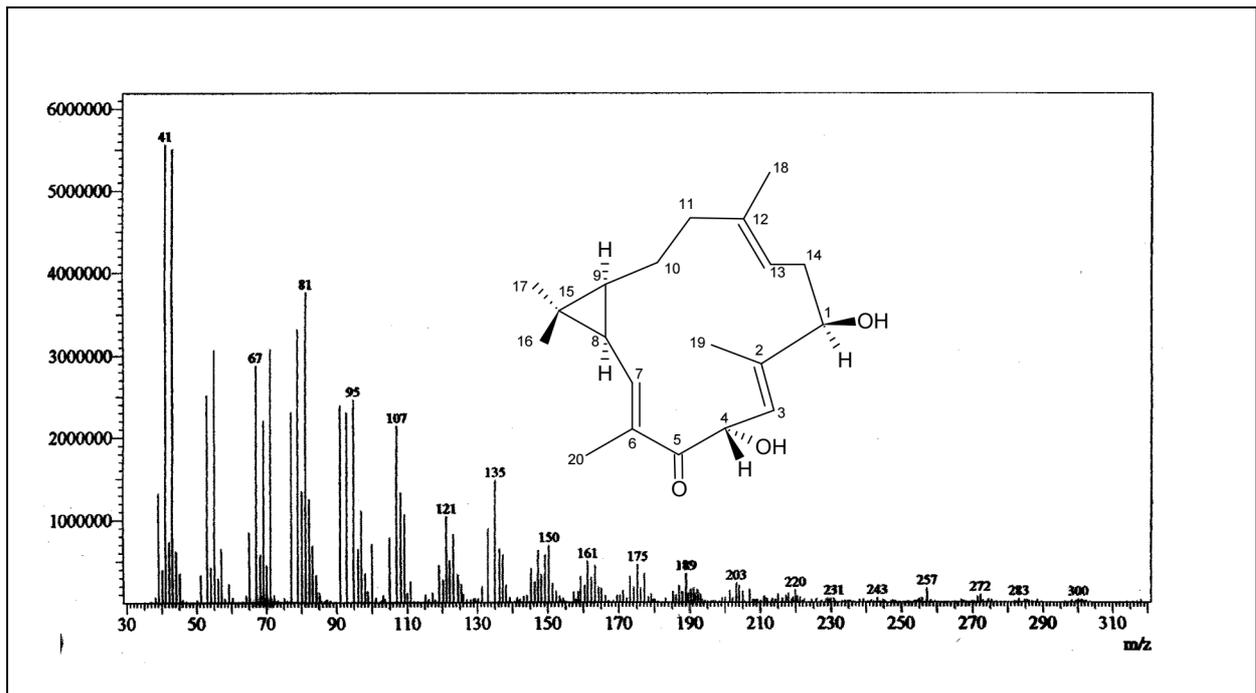


Figura 12 - Espectro de massas de diterpeno casbano

## 2 OBJETIVOS:

### 2.1 Geral

- Avaliar atividade bactericida contra *P. aeruginosa* (ATCC 10145) de lectinas isoladas de sementes de *Erythrina fusca* e *velutina*, de algas marinhas *Hypnea musciformes*, *Bryothamnion seaforthii* e *triquetrum* e do diterpeno casbano, um produto natural isolado de *C. nepetaefolius*.

### 2.2 Específicos

- Comparar a ação *in vitro* de 5 lectinas isoladas de sementes de *E. fusca* e *velutina*, bem como as lectinas de algas marinhas: *H. musciforme*, *B. seaforthii* e *B. triquetrum* e do produto natural diterpeno casbano, sobre colônias de *P. aeruginosa*.
- Descrever o efeito das lectinas isoladas da alga marinha *H. musciforme* e da semente *Erythrina velutina* e do diterpeno casbano, no processo de formação do biofilme bacteriano de *P. aeruginosa*.
- Identificar entre as lectinas de *E. velutina*, *H. musciforme* e do diterpeno casbano, aquele com maior potencial de aplicação no controle do crescimento de colônias de *P. aeruginosa*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); INCQS: 00311; ORIGEM: ATCC 10145.

#### 3.2 Isolamento das lectinas / Diterpeno casbano.

As lectinas estudadas (Tabela 3) foram isoladas e purificadas no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

**Tabela 3 - Lectinas de acordo com especificidade por carboidratos e referência**

Lectinas	Sigla	Especificidade	Referência
<i>Erythrina velutina</i>	EVL	Galactose	MORAES <i>et al.</i> , 1996
<i>Erythrina fusca</i>	EFL	Galactose	
<i>Hypnea musciformis</i>	HML	Mucina	NAGANO <i>et al.</i> , 2005
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	BSL	Mucina/Fetaina/Avidina	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	BTL	Mucina/Fetaina/Avidina	AINOUZ <i>et al.</i> , 1995

*C. nepetaefolius* (caule) foi coletado no município de Caucaia. A excicata da espécie estudada encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número 33582, sendo identificadas pelo professor Edson de Paula Nunes.

#### 3.3 Procedimentos experimentais gerais utilizados na determinação estrutural do diterpeno casbano

O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho, foi um espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT. Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da METTLER TOLEDO. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-300 e DPX-500 ( $^1\text{H}$ : 300 e 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 75 e 125 MHz),

utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente e TMS como padrão interno. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas, aparelho Shimadzu QP5050A, operando em 70 eV.

### **3.4 Isolamento do diterpeno casbano do extrato etanólico do caule de *Croton nepetaefolius***

O caule (5 kg), seco à temperatura ambiente, foi triturado e submetido à extração a frio com etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida fornecendo o extrato etanólico (58,2 g), que foi adsorvido em 30 g de gel de sílica e submetido à coluna cromatográfica contendo 120 g de gel de sílica, utilizando os eluentes: hexano (F 1-15), hexano/acetato de etila (1:1 F 16-25), acetato de etila (F 26-40) e etanol (F 41-48), obtendo-se um total de quarenta e oito frações, de 100 mL cada. As frações hexânicas (F 1-15) 22,5 g foram reagrupadas, adsorvidas em 40 g de gel de sílica e recromatografadas sobre 90 g de gel de sílica com hexano (F' 1-10), hexano/acetato de etila (1:1 F' 11-16), acetato de etila (F' 17-21) e etanol (F' 22-25), obtendo-se um total de vinte e cinco frações, de 50 mL cada. As frações (F' 11-16) 14,04 g foram reunidas, adsorvidas em 29 g de gel de sílica e submetidas a novo tratamento cromatográfico sobre 50 g de gel de sílica com hexano (F'' 1), hexano/acetato de etila (9:1 F'' 2-5; 8:2 F'' 6-15; 7:3 F'' 16-32) e acetato de etila (F'' 33) obtendo-se um total de trinta e três frações, de 25 mL cada. As frações (F'' 10-13), obtidas com hexano/acetato de etila (8:2), reunidas forneceram 3 g do diterpeno 1,4-dihidroxi-2*E*,6*E*,12*E*-trien-5-ona (SANTOS *et al.*, 2008).

### **3.5 Cultura Bacteriana**

O microorganismo foi crescido a partir da inoculação de 100  $\mu\text{L}$  de uma cultura estoque, mantida em Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol, em 10 mL de BHI por 24 horas à 37 °C. Após a ativação inicial, 200  $\mu\text{L}$  dessa cultura foram adicionados a 20 mL de BHI, sempre mantendo a proporção de 100  $\mu\text{L}$  da cultura para cada 10 mL de meio estéril. Em seguida foi realizada centrifugação (12.000 rpm; 10 minutos ; - 4 °C), lavada quatro vezes com NaCl 0,15 M. Após esta etapa, foi obtida uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL, através de diluição, utilizando a escala de MAC FARLAND e observado a absorvância por espectrofotometria a 600 nm, com leitura igual a 0,101.

A escala de MAC FARLAND consiste na aferição indireta da turvação (turbidimetria) de uma suspensão bacteriana através da dispersão da luz, tendo como parâmetro a turvação obtida pela mistura de quantidades variáveis de uma solução de cloreto de bário a 1% e de ácido sulfúrico a 1%. Normalmente, considera-se que o tubo número 1 da escala de MAC FARLAND corresponda a uma amostra contendo  $3,0 \times 10^8$  UFC / mL.

### **3.6 Determinação da atividade hemaglutinante das lectinas**

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados com hemácias de coelho. Para tanto, o sangue coletado foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 4.000 x RPM. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lavadas com solução de NaCl 0,15 M por 5 ciclos de centrifugação. As hemácias lavadas foram diluídas para uma concentração final de 2%. Parte desta solução foi tratada com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína, 0,1 mg de enzima para 10 mL de sangue diluído a 2%) como descrito por Ainouz *et al.*(1992).

A atividade hemaglutinante das lectinas foi determinada por diluições seriadas em tubos de ensaio. Foi preparado uma solução de lectina na concentração de 2 mg /mL em tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 7,6. Ao primeiro tubo de ensaio foi adicionado 100 µl de solução de lectina (2mg/ml) e, em seguida, foram feitas uma série de diluições (1/2 até 1/8). A cada tubo de ensaio foi adicionado 100 µl de hemácias coelho a 2% (v/v), e a reação incubada a 37° C por 30 minutos. Após repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, a leitura dos ensaios foi realizada por inspeção macroscópica da ocorrência de aglutinação.

### **3.7 Ensaio de Atividade Antibacteriana**

O microorganismo foi crescido a partir da inoculação de 100 µL de uma cultura estoque, mantida em Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol, em 10 mL de BHI por 24 horas à 37 ° C. Após essa ativação inicial, a cultura foi renovada em mais 10 mL de BHI caldo estéril com inoculação de 100 µL e crescidos nas mesmas condições descritas acima. Essa renovação foi feita para obter um microorganismo com melhor crescimento e desenvolvimento. Em seguida, a cultura foi centrifugada, lavada duas vezes com NaCl 0,15 M, sendo em seguida ajustada sua concentração com auxílio de espectrofotômetro, para com absorbância de 0,101, correspondente à turbidez do tubo 0,5 da escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Após o ajuste da concentração as soluções de lectinas foram preparadas, em concentrações que variavam de 1mg/mL a 7,8 µg/mL e mantidas em estoque até a utilização.

Em tubos tipo *ependorfs* foram distribuídas 100 µL das soluções de lectinas em cada uma das concentrações e após foi adicionado 100 µL da solução bacteriana ajustada. Após a inoculação os tubos foram incubados a 37 ° C por 6 horas. Para os grupos controles, foram utilizados 100 µL NaCl 0,15 M e 100 µL de solução de albumina sérica bovina (BSA) nas mesmas concentrações das lectinas. Em seguida, as soluções foram retiradas da estufa e realizada a inoculação com 4 µL da solução contendo as bactérias em contato com a lectina, em placa de microtitulação (ELISA) contendo 200 µL de BHI. A primeira leitura foi considerada como tempo zero. Após esse procedimento, a placa foi incubada a 37° C, sendo realizadas leituras nos tempos de 6 h, 12 h, 18 h, e 24 horas em Leitor de ELISA (BioTrak II – Plate Reader) com comprimento de onda de 620 nm.

Já para o diterpeno casbano foram utilizadas concentrações que variaram de 1 mg/mL a 125 µg/mL, adicionadas aos *ependorfs* num volume de 100 µL, juntamente com 100 µL da solução bacteriana ajustada. Em seguida, as soluções foram retiradas da estufa e realizada inoculação com 4 µL da solução, em placa de microtitulação (ELISA) contendo 200 µL de BHI. A primeira leitura foi considerada como tempo zero. Após esse procedimento a placa foi incubada a 37 °C e realizadas leituras nos tempos de 6, 12, 18, e 24 horas em Leitor de ELISA (BioTrak II – Plate Reader) com comprimento de onda de 620 nm.

### **3.8 Ensaio da formação do biofilme bacteriano utilizando diferentes meios de cultura.**

O ensaio de aderência de *P. aeruginosa* em placa de ELISA foi realizado segundo a metodologia descrita por O'TOOLE - KOLTER (1998), com algumas adaptações. Para esse ensaio foram utilizados os seguintes meios: Brain Heart Infusion (BHI), Luria-Bertani (LB) e Tryptic Soy Broth (TSB). Após uma ativação inicial, uma cultura estoque foi renovada em mais 10 mL de BHI caldo estéril com inóculo de 100 µL e crescidos por 24 horas a 37 °C. Em seguida, a cultura foi centrifugada, lavada três vezes com NaCl 0,15 M e após ajustada para uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (segundo a escala de MacFarland 0,5). Após o ajuste da concentração, 200 µL dos meios de cultura (BHI, LB e TSB) foram distribuídos em placa de microtitulação, e realizada inoculação com 4 µL de solução bacteriana. Após a montagem, a placa foi incubada a 37 °C, e a análise da formação de biofilmes realizada nos tempos de 12 e 24 horas.

Passada esta etapa, as placas foram retiradas da estufa e lavadas três vezes com água destilada (Biotrak II – Plate Wash) sendo em seguida adicionado 200 µL de cristal

violeta a 1% por 15 minutos. Após a coloração com o cristal violeta o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada sob temperatura ambiente por 1 hora. Em cada poço foram adicionados 200 µL de ácido acético 33%, e, após 15 minutos, a suspensão foi transferida para outra placa de microtitulação de fundo chato. Em seguida foi realizada a quantificação em leitor de ELISA usando comprimento de onda de 595 NM (Genequant-*Pro*).

### **3.9 Ensaio de inibição da formação do biofilme bacteriano em placas de poliestireno (96 poços) usando lectinas/diterpeno casbano.**

O ensaio de aderência de *P. aeruginosa* em placas de poliestireno foi realizado segundo a metodologia descrita por O'TOOLE-KOLTER (1998), com algumas adaptações. As soluções de cada lectina foram testadas em concentrações variando de 1 mg/mL e 500 µg/mL e o diterpeno casbano nas concentrações de 1 mg/mL a 125 µg/ml. Após ativação, uma cultura estoque foi renovada em mais 10 mL de BHI caldo estéril com inoculação de 100 µL e crescido por 24 horas a 37 °C. Em seguida, a cultura foi centrifugada, lavada duas vezes com tampão fosfato 0,1 M contendo NaCl 0,15 M, pH 7,2, sendo ajustada para uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL utilizando espectrofotometro. Após o ajuste da concentração, 50 µL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços da placa junto com 50 µL de solução de lectina em cada uma das concentrações (1mg/ml e 500 µg/ml). Para o controle foi utilizado BSA, nas mesmas concentrações. Em seguida, as placas foram colocadas na estufa a 37 °C por duas horas e após este período, os poços já utilizados foram completados com 100 µL de caldo BHI. Os poços restantes foram completados com 100 µL de diterpeno casbano nas concentrações descritas acima, juntamente com 100 µL de BHI e 4 µL da suspensão ajustada da bactéria. O controle foi feito utilizando-se solução de NaCl 0,15 M, pH 7,2. As placas foram incubadas a 37 °C por períodos de 24, 48 e 72 horas. Passado esse tempo as placas foram retiradas da estufa e lavadas três vezes com água destilada (Biotrak II – Plate Wash), sendo depois adicionados 200 µL de cristal violeta a 1% por 15 minutos. Após a coloração com o cristal de violeta o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada sob temperatura ambiente por 1 hora. Em cada poço foram adicionados 200 µL de ácido acético 33%, e, após 15 minutos, a suspensão foi transferida para outra placa de microtitulação de fundo chato e seguida realizada a quantificação em leitor de ELISA com comprimento de onda de 595 nm (Genequant - *Pro*).

#### **4 ANALÍSE ESTATÍSTICA**

Os resultados dos testes de inibição da formação do biofilme bacteriano foram demonstrados através de gráficos. A diferença entre médias de replicatas foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com Bonferroni post-test executados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, Software GraphPad, San Diego California USA. Para esses testes foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,01$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade hemaglutinante

As lectinas isoladas de sementes de *E. velutina* e *E. fusca*, bem como as lectinas de alga marinha *H. musciformis*, *B. seaforthii* e *B. triquetrum* foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho em todas as diluições testadas, demonstrando a viabilidade destas proteínas para os ensaios utilizando *P. aeruginosa*.

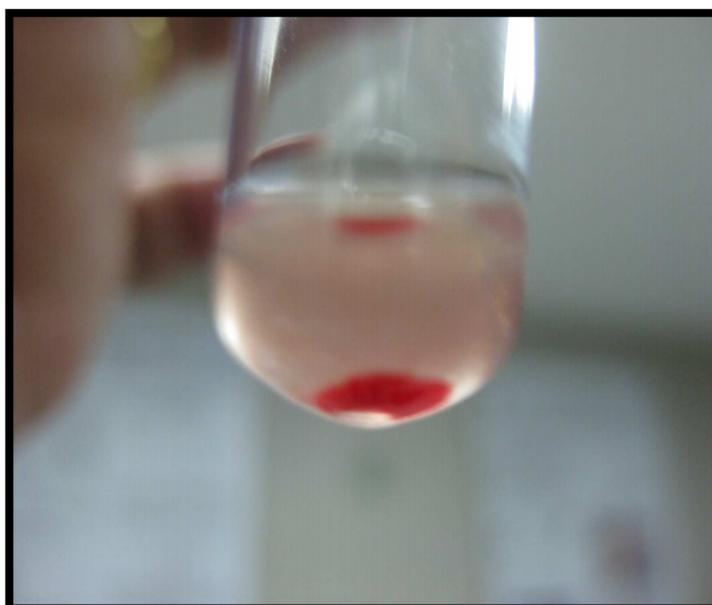
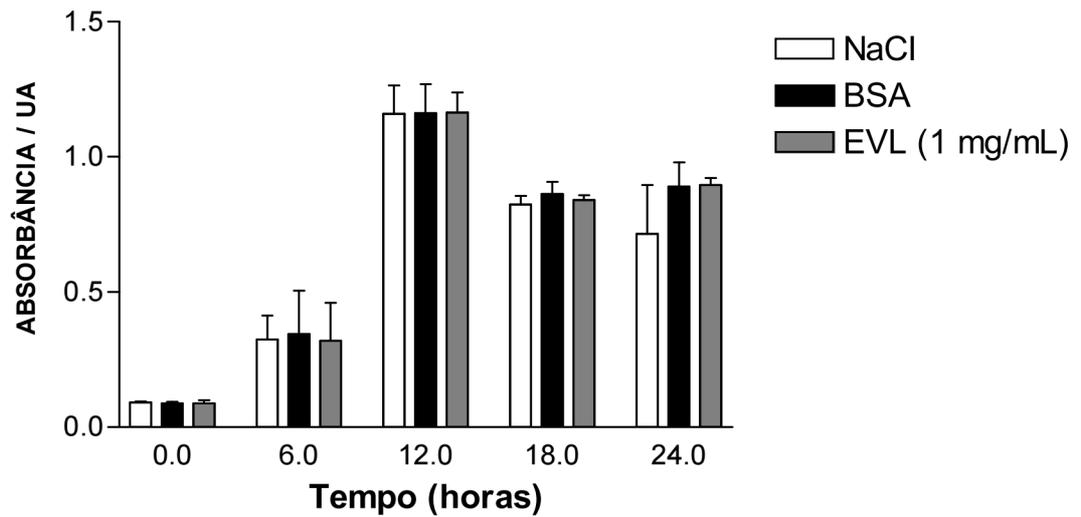


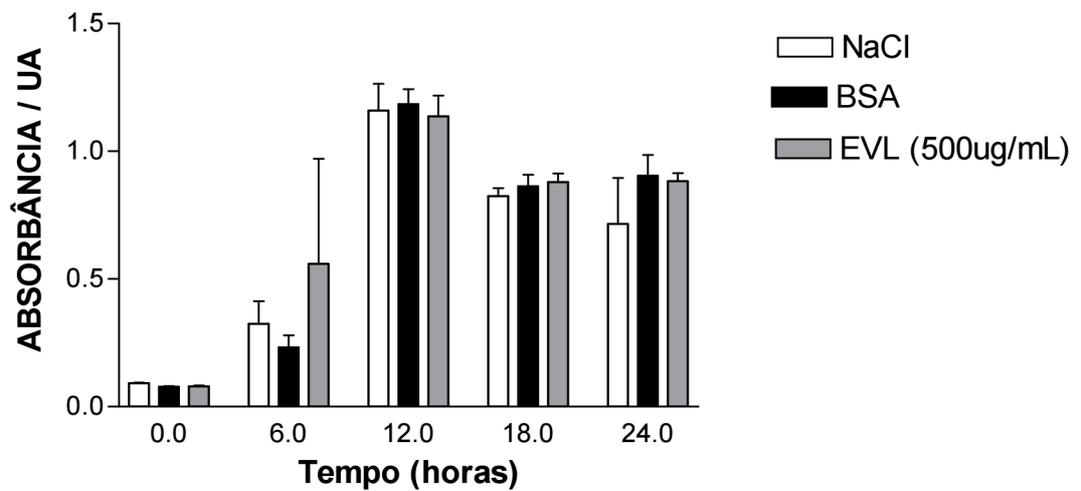
Figura 13 - Fotografia de um coágulo obtido após incubação de *Hypnea musciformis* com hemácias de coelho a 2% tratada com tripsina.

### 5.2 Atividade Antibacteriana

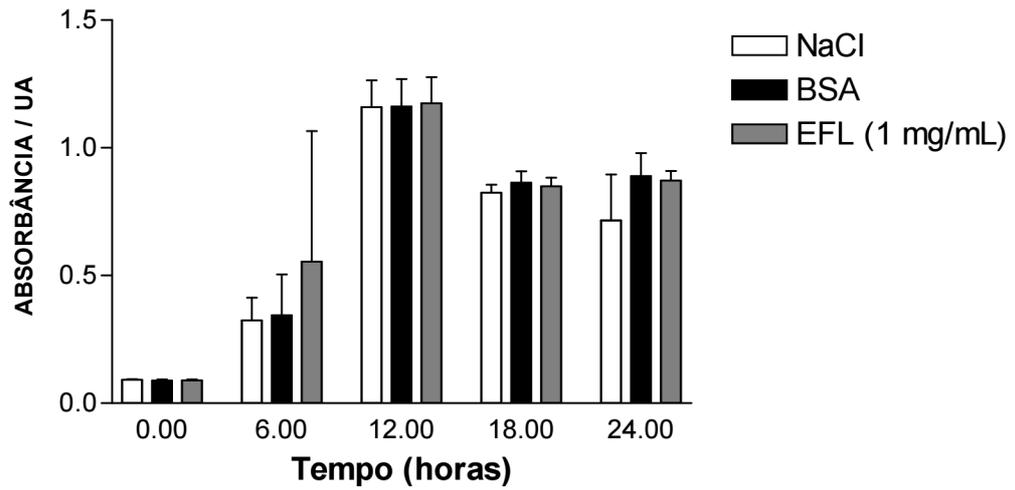
Nenhuma das lectinas testadas foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 10145 nas condições experimentadas (Gráficos 1 a 10, pág 52-56). Por outro lado, diterpeno casbano na concentração de 500 µg/mL em 18 horas foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* em 40% comparado ao controle (H<sub>2</sub>O Mili - Rios). Esta inibição foi observada até uma concentração de 125 µg/mL (Gráfico 11, pág 57).



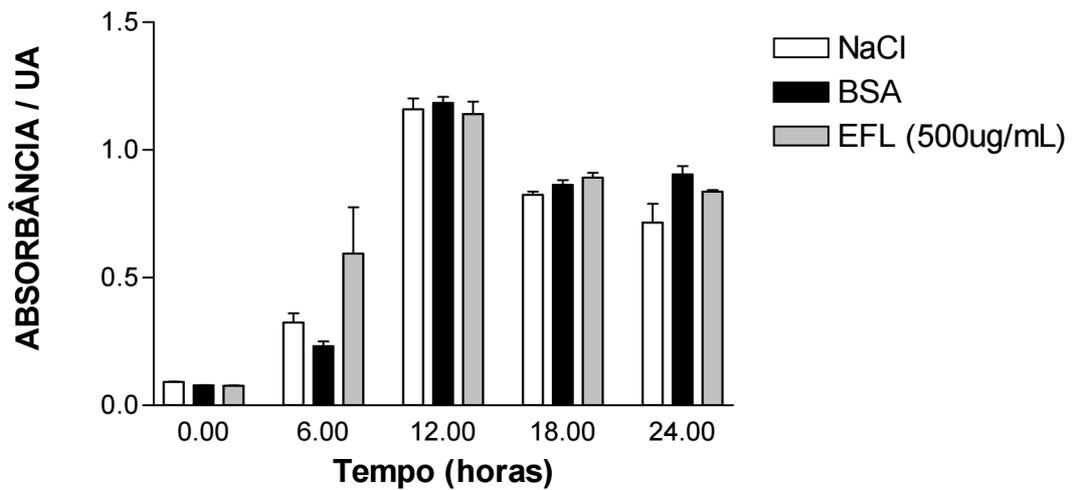
**Gráfico 1** - Atividade da lectina de sementes de *E. velutina* (1mg/mL) sobre o crescimento de *P. aeruginosa* ( $A = 620$  nm).



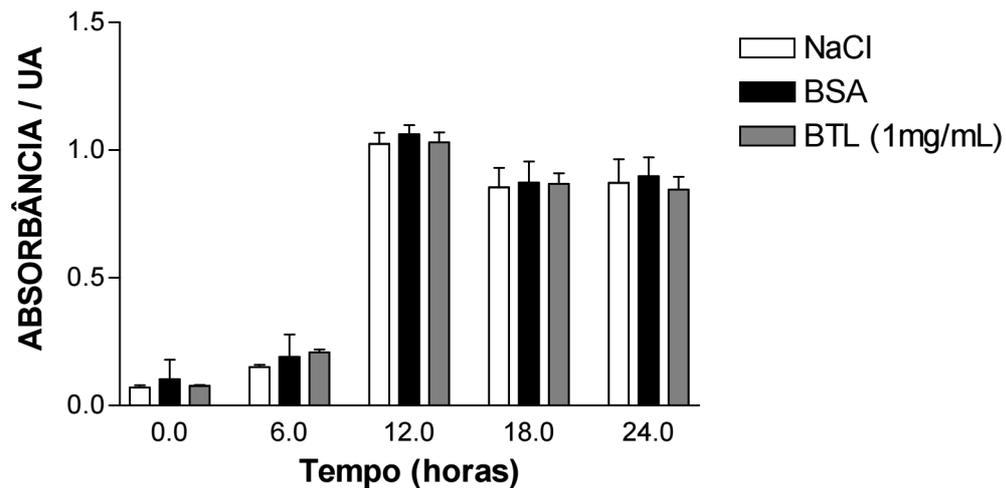
**Gráfico 2** - Atividade da lectina de sementes de *E. velutina* (500 µg/mL) sobre o crescimento de *P. aeruginosa* ( $A = 620$  nm).



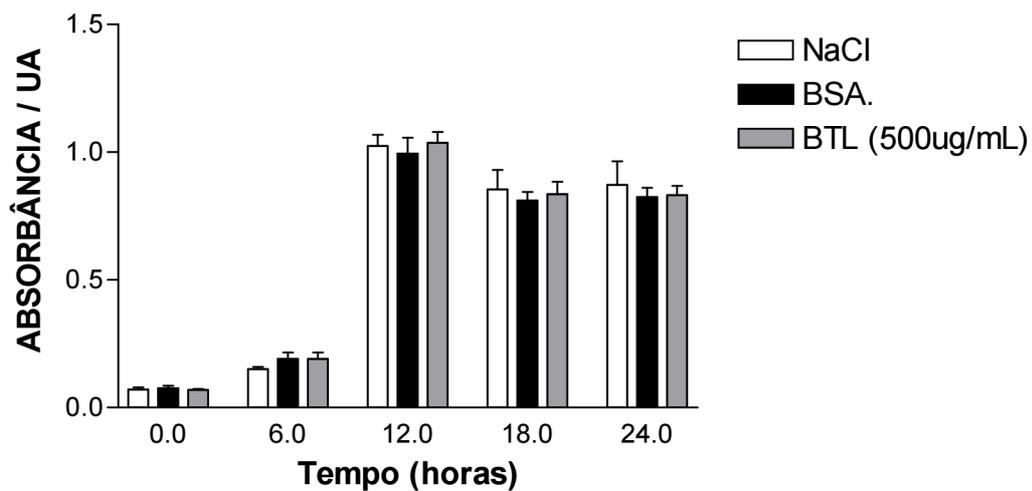
**Gráfico 3** - Atividade da lectina de *E. fusca* (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* ( $A = 620$  nm).



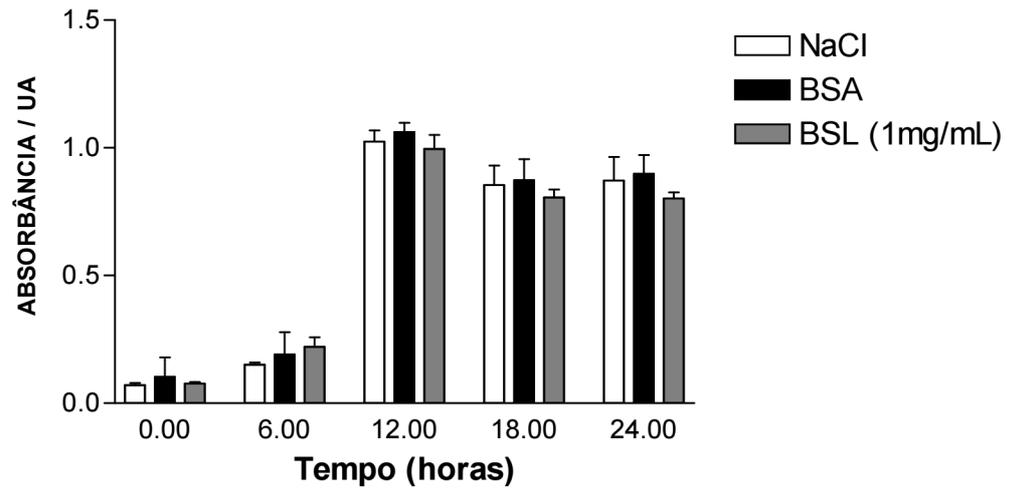
**Gráfico 4** - Atividade da lectina de *E. fusca* (500 µg/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* ( $A = 620$  nm).



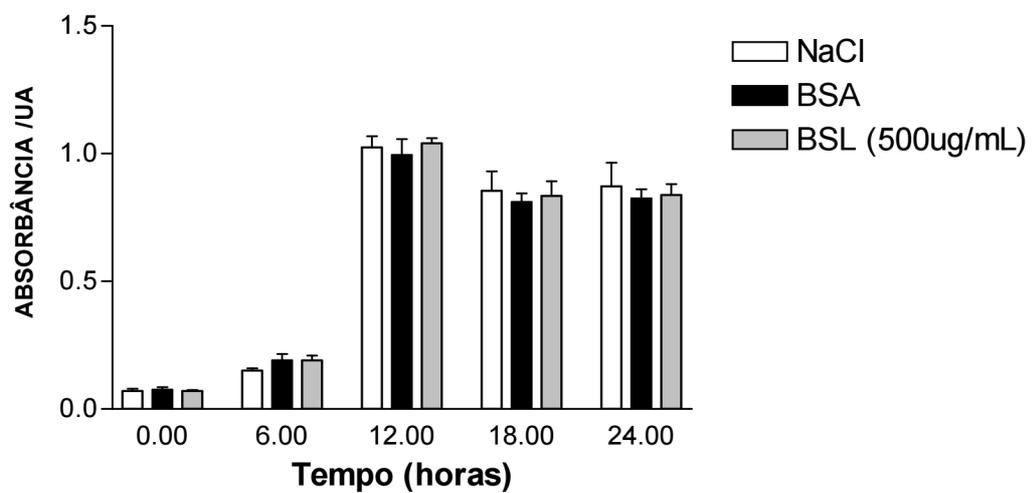
**Gráfico 5** - Atividade da lectina de *B. triquetrum* (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* (A = 620 nm).



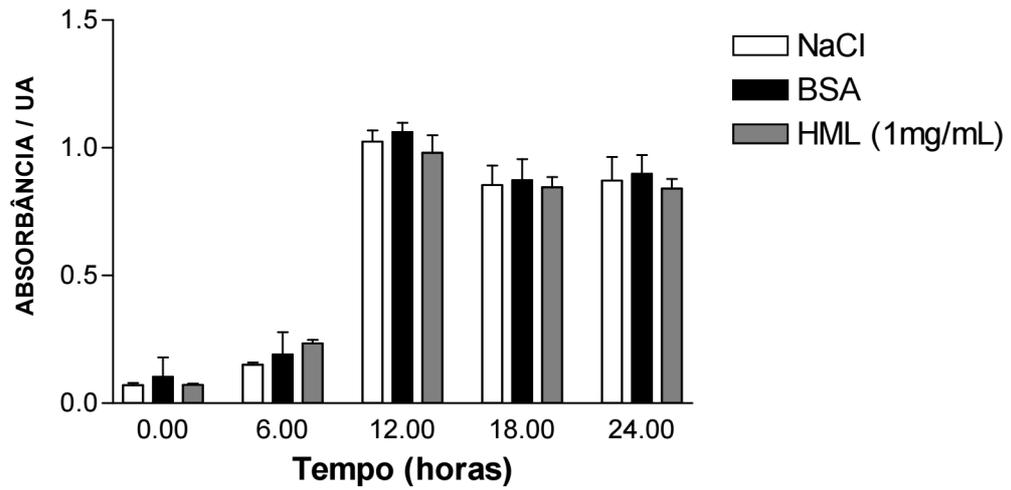
**Gráfico 6** - Atividade da lectina de *B. triquetrum* (500µg/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* (A = 620 nm).



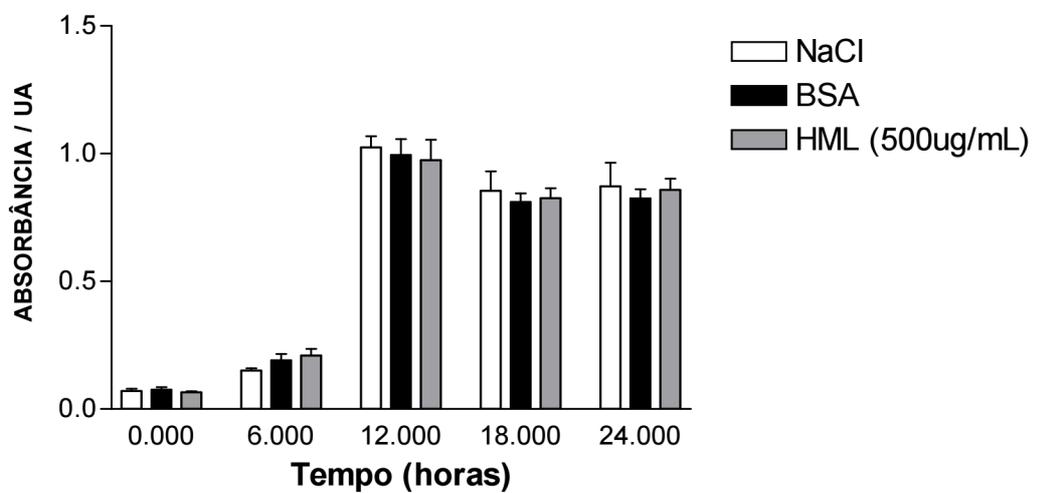
**Gráfico 7** - Atividade da lectina de *B. seaforthii* (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* (A = 620 nm).



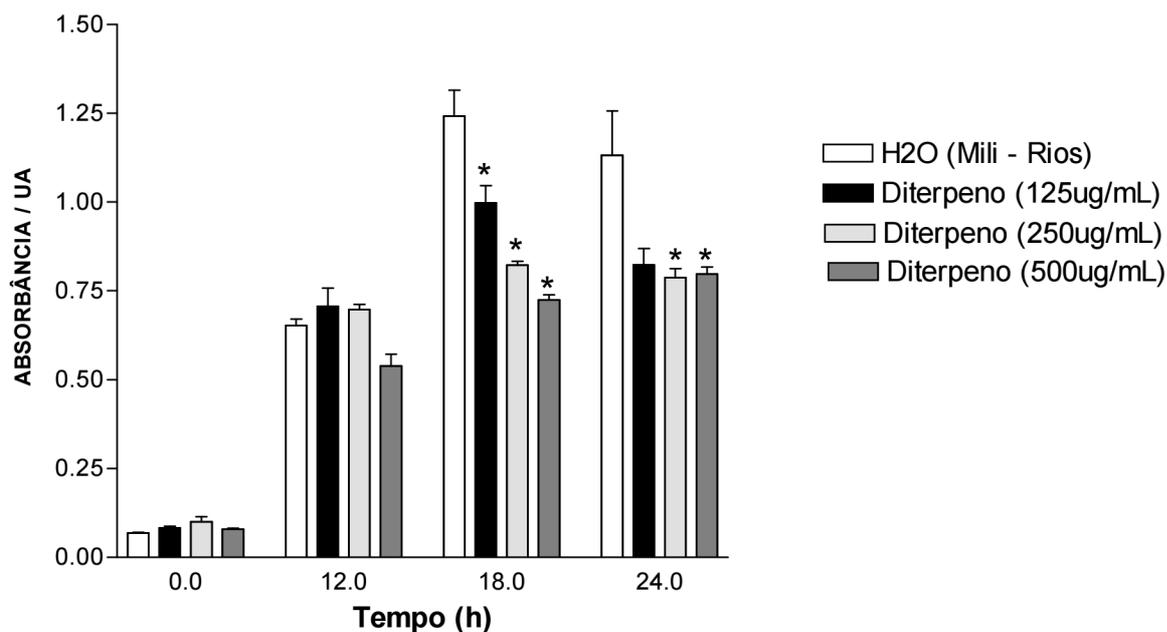
**Gráfico 8** - Atividade da lectina de *B. seaforthii* (500  $\mu$ g/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* (A = 620 nm).



**Gráfico 9** - Atividade da lectina de *H. musciformis* (1mg/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* (A = 620 nm).



**Gráfico 10** - Atividade da lectina de *H. musciformis* (500  $\mu$ g/mL) sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* (A = 620 nm).

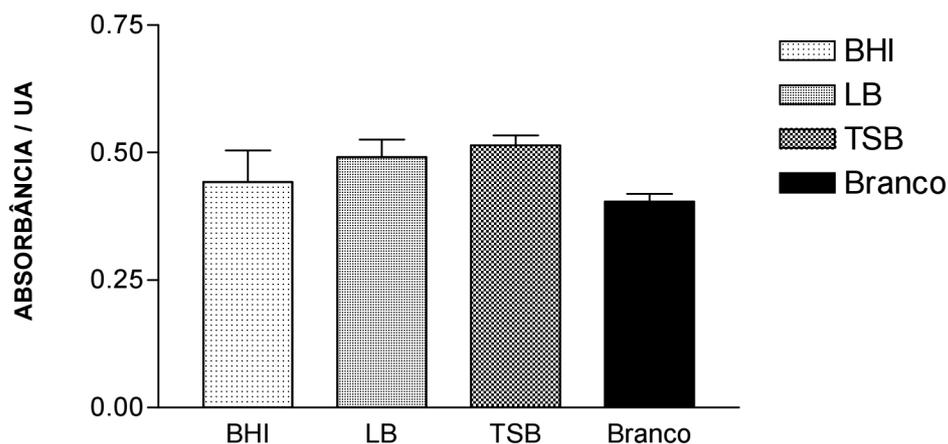


P<0,01 \* Diferença estatística em relação ao controle.

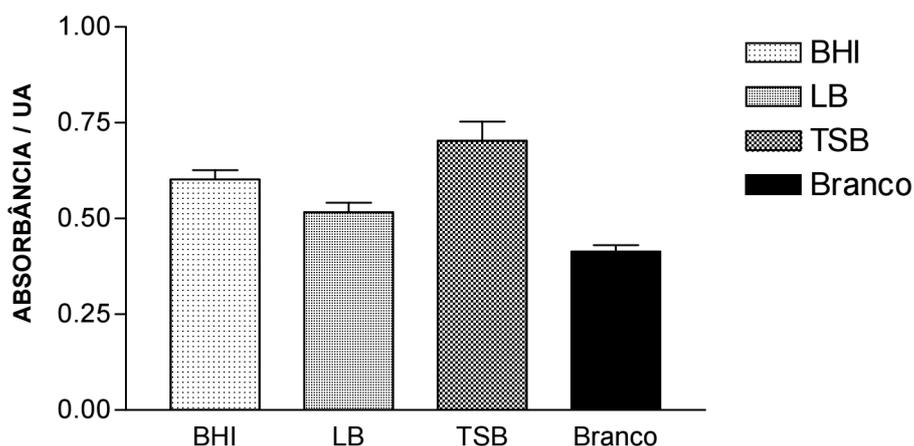
**Gráfico 11** - Atividade do diterpeno casbano nas diferentes concentrações sobre o crescimento microbiano de *P. aeruginosa* ( $A = 620 \text{ nm}$ ).

### 5.3 Ensaio da formação do biofilme bacteriano utilizando diferentes meios de cultura

Em ensaio de formação de biofilme em placas de microtitulação, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 mostraram uma discreta formação de biofilme, não havendo diferença estatística significativa entre os meios de cultura utilizados no experimento, conforme demonstrado nos gráficos 12 e 13.



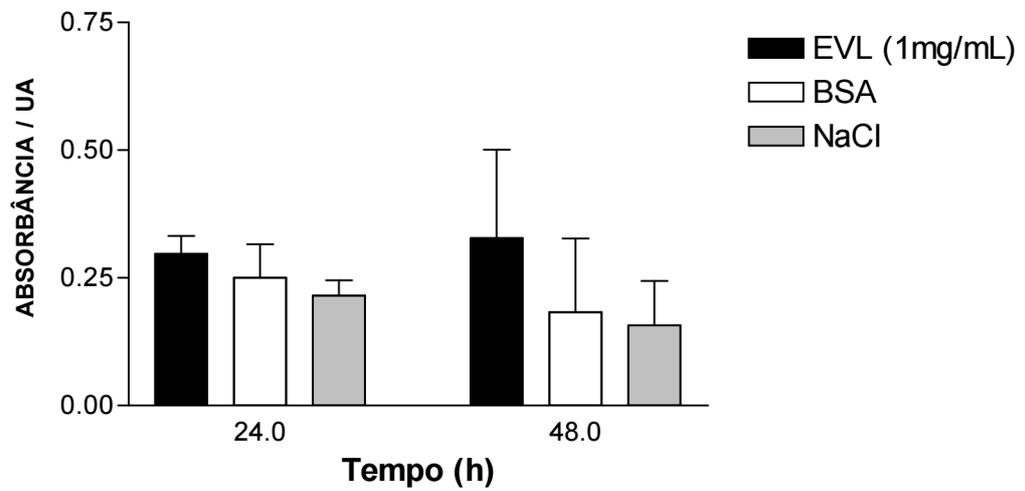
**Gráfico 12** - Ensaio de formação de biofilme de *P. aeruginosa* após 12 horas de incubação nos meios Brain Heart Infusion (BHI), Luria-Bertani (LB) e Tryptic Soy Brouth (TSB) (A = 595 nm).



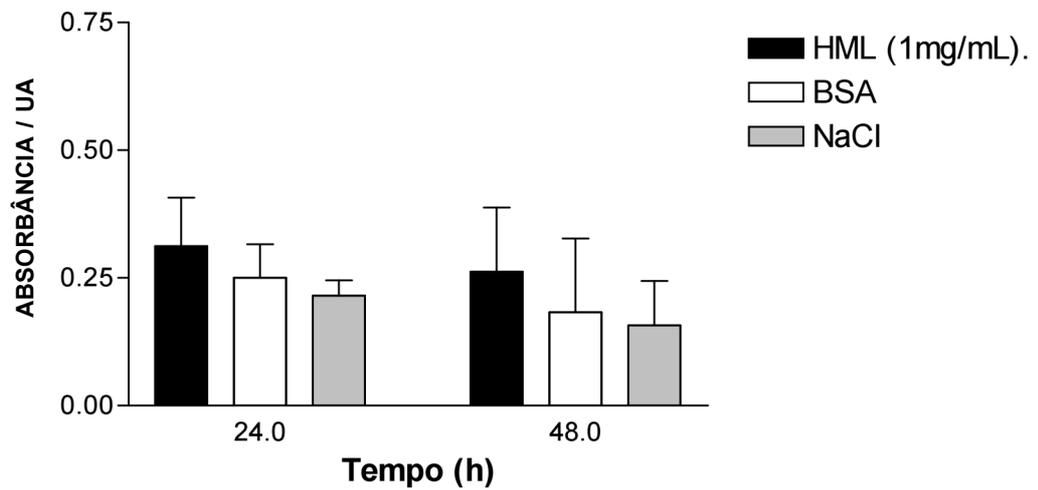
**Gráfico 13** - Ensaio de formação de biofilme de *P. aeruginosa* após 24 horas de incubação nos meios Brain Heart Infusion (BHI), Luria-Bertani (LB) e Tryptic Soy Brouth (TSB) (A = 595 nm).

#### 5.4 Inibição da formação de biofilme bacteriano em placas de poliestireno de 96 poços através do tratamento com a lectinas

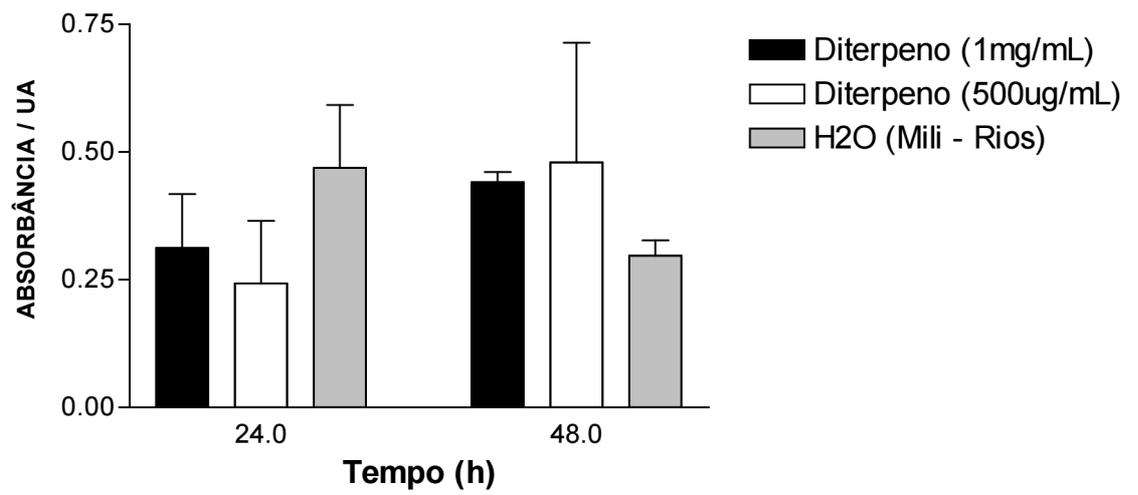
As lectinas, *E. velutina* e *H. musciformis*, utilizadas nos ensaios de inibição da formação de biofilme bacteriano foram submetidas previamente ensaio de atividade hemaglutinante para atestar sua atividade biológica. As bactérias foram quantificadas utilizando cristal de violeta a 1%, de acordo com O'toole - Kolter (1998). Os resultados não demonstraram inibição da formação do biofilme da cepa bacteriana testada pelas lectinas *E. velutina* (EVL), *H. musciformis* (HML) e diterpeno casbano nas concentrações utilizadas (gráficos 14 a 16).



**Gráfico 14** - Atividade da lectina de sementes de *E. velutina* (1mg/mL) sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* ( $A = 595$  nm).



**Gráfico 15** - Atividade da lectina de *H. musciformis* (1mg/mL) sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* ( $A = 595$  nm).



**Gráfico 16** - Atividade do diterpeno casbano nas diferentes concentrações sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* ( $A = 595 \text{ nm}$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com intuito de avaliar o uso de produtos naturais como possível insumo terapêutico. Para tanto, avaliou-se a atividade biológica de duas lectinas de sementes *Erythrina Velutina* e *E. Fusca*, bem como as lectinas de algas marinhas *Hypnea musciformis*, *Bryothamnion. seaforthii* e *B. triquetrum*, assim como do diterpeno casbano, produto natural extraído de *Croton nepetaefolius* sobre o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa*, tanto na forma planctônica, através de ensaio de MIC, como na forma de biofilme.

Conforme demonstrado em outros trabalhos as lectinas vegetais podem exercer um efeito antibacteriano frente a diversas bactérias, seja sobre a forma planctônica (OLIVEIRA *et al.*, 2008) ou sobre biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Estes efeitos podem ser explicados através da ligação entre a lectina e os carboidratos bacterianos, que levam ao dano celular bacteriano ou impedem à adesão a superfície que servirá de base para a formação de biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Holanda *et al.* (2005) demonstrou que a lectina isolada da alga vermelha *Solieria filiformis* inibiu crescimento da *P. aeruginosa* na forma planctônica, sendo justificado pela interação com glicoconjugado manana, presente na superfície celular das bactérias gram negativas, promovendo alteração no fluxo de nutrientes e explicando, assim, o efeito bacteriostático.

O estudo de Aristoteli e Willcox (2006) demonstrou diminuição da aderência *P. aeruginosa* ao olho humano, pelo uso de lectina extraída *Sambucus nigra*, provavelmente por inibição competitiva dos receptores de adesão bacteriana no olho pela lectina.

No presente estudo as lectinas utilizadas não interferiram no desenvolvimento da cepa testada, tanto na forma planctônica como no biofilme, provavelmente pela falta de especificidade da ligação entre lectina e carboidratos expostos na superfície bacteriana. Convém considerar o fato de que as 2 lectinas presentes na superfície *P. aeruginosa*, Lec A (PA - IL) e Lec B (PA - IIL), fundamentais para formação do biofilme, localizam-se principalmente no citoplasma da célula e apenas uma pequena fração estaria presente na superfície celular (GLICK; GARBER, 1983 ) podendo assim interferir na ação das lectinas testadas. Outro fator a ser considerado diz respeito à variação sazonal da presença de lectinas em algas marinhas. Estudos têm demonstrado que existe uma variação sazonal quanto à presença de atividade hemaglutinante em algas marinhas (TAKAHASHI; KATAGIRI, 1987; ZAVODNIK, 1987; BENEVIDES *et al.*, 1999), sendo que a época do ano em que as algas

são coletadas está relacionada ao nível de atividade detectada e que está diretamente ligado ao ciclo de vida da planta (crescimento e reprodução) (SAMPAIO *et al.*, 1996).

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ser adquiridos ou intrínsecos (FAJARDO *et al.*, 2008). A resistência adquirida pode ocorrer por mutação ou aquisição de genes resistência de outros microorganismos. Genes resistência adquirida podem ser capazes de produzir enzimas inativando produto antibacteriano, modificar alvos de ação dos antimicrobianos ou expressar mecanismos de efluxo que previnem ação dos antibacterianos sobre os alvos intracelulares. Bombas de efluxo específicas para antibacterianos são determinantes importantes para resistência intrínseca e/ou adquirida (LOMOVSKAYA; WATKINS, 2001). A *Pseudomonas aeruginosa* possui bomba de efluxo (MeXY-OprM) que está envolvida na resistência aos aminoglicosídeos e cefalosporina de quarta geração (HOCQUET *et al.*, 2003). O estudo de Melzig *et al.* (2001) utilizando triterpeno e saponina demonstrou que estes compostos foram capazes de inibir a bomba de efluxo em *S. aureus*, alterando a permeabilidade membrana.

Em nosso trabalho, observamos que o diterpeno casbano foi capaz de inibir o crescimento da cepa *P. aeruginosa* na sua forma planctônica em cerca de 40%, na concentração de 500 µg/mL, com 18 horas de crescimento. Porém, não demonstrou inibição do crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* nas concentrações utilizadas neste estudo. Na verdade, a disposição da *P. aeruginosa* sob a forma de biofilme causa atraso na penetração do agente antimicrobiano, onde a matriz do biofilme representa uma barreira difusional para essas moléculas, influenciando na sua taxa de transporte para o interior do biofilme (MARSHALL, 1976). É também observada alteração na taxa de crescimento do biofilme, uma vez que células associadas ao biofilme crescem de modo significativamente mais lento que células na forma planctônica. Como resultado, a captação de agentes antimicrobianos é mais lenta (ANWAR *et al.*, 1992). O estudo atual não conseguiu elucidar o efeito inibitório do diterpeno casbano sobre a forma planctônica de *P. aeruginosa*. Porém, existe a possibilidade do mecanismo de ação estar relacionado à inibição dos sistemas de efluxo.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos neste estudo que as lectinas isoladas de sementes, *E. velutina* e *E. fusca*, bem como as lectinas de alga marinha *H. musciformis*, *B. seaforthii* e *B. triquetrum* não foram capazes de inibir o crescimento da cepa *P. aeruginosa* ATCC 10145 na sua forma planctônica e na forma de biofilme com utilização da lectina *E. velutina* e *H. musciformis*. A utilização do diterpeno casbano inibiu crescimento na forma planctônica, não inibindo a formação do biofilme da *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Os dados encontrados apontam para um potencial antibacteriano do diterpeno casbano, com a possível utilização dessa molécula como ferramenta biológica. Novos estudos com aprofundamento da atividade biológica e elucidação do mecanismo de ação do diterpeno casbano sobre *P. aeruginosa* e outros patógenos são necessários. Estes envolvem testes de citotoxicidade e estabelecimento de protocolos em seres humanos, através dos quais se buscará inseri-lo como insumo terapêutico contra diversas infecções.

## 8 Referências Bibliográficas

ABDOM, A. P. V. ; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 35, p. 1215 - 1219, 2002.

SRINIVASAN, A.; WOLFENDEN, L. L.; SONG, X.; HARTSELL, T. L.; JONES, H. D. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with flexible bronchoscopes. **N Engl J Med**, v. 348(3), p. 221-227, 2003.

STEPP, J. R. The role of weeds s sources of pharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.** v. 92, p. 163-166, 2004.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-138, 2001.

SUCI, P. A.; MITTELMAN, F. P.; GEESEY, G. G. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antibicrob Agents Chemother**, v. 38, p. 2125- 2133, 1994.

TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S. Seasonal variation of the hemagglutinating activities in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Nippon Suissan Gakkaishi**, v. 53, p. 2133-2137, 1987.

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. T.;GONÇALVES, R. B.; FARIAS, W. R. L.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 101 p. 111-116, 2007.

VALENTE, E.; ASSIS, M. C.; ALVIM, I. M. P. PLOTKOWSKI, M. C. *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in human endothelial cells. **Microb Pathogen**, v. 29, p. 345-356, 2000.

VALLET, I.; OLSON, J. W.; LORY, S.; FILOUX, A. The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene cluster and their involvement in biofilm formation. **Proc Natl Acad**, v. 98, p. 6911-6916, 2001.

VAN ASPEREN, I. A. DE ROVER, C. M.; SCHIJEN, J. F.; VAN LEEUWEN, N. J. Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes. **BMJ**, v. 311, p. 1407-1410, 1995.

VAN DAMME, E. J.; BRIKE, F.; WINTER, H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN I. J.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur J Biochem**, v. 236( 2), p. 419-427, 1996.

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

VELASCO, E.; THULER, L. C., MARTINS, C. A.; GONÇALVES, V. M. nosocomial infections in an oncology intensive care unit. **Am J Infect Control**, v. 25 (6), p. 458-462, 1997.

VERA, L. A.; MONTE, F. J. O.; BRAZ -FILHO, R. A new casbane-type diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. **J. Nat. Prod.** v. 53(6), p. 1566-1571, 1990.

VERA, R.; SMADJA, J.; CONAN, J. Y. Preliminary assay of some plants with alkaloids from Reunion Island. **Plant Med. Phytother.** v. 24, p. 50-65, 1990.

VINCENT, J. L.; BIHARI, D. J.; SUTER, P. M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care. **JAMA**, v. 274, p. 639-644, 1995.

VOLK, W.; BENJAMIN, D.;KADNER, R. Essentials of medical microbiology. **Grand Rapids**, 4<sup>a</sup>ed.J.B. Lippincott, 1991.

VON BISMARCK, P.; SCHNEPPENHEIM, R.; SCHUMACHER, U. Successful treatment of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection with a sugar solution-a case report on a lectin based therapeutic principle. **Klin Padiatr**, v. 213, p 285-287, 2001.

WANG, S.; ZHONG, F-D.; ZHANG, Y-J.; WU, Z-J.; LIN, Q-Y.; XIE, L-H. Molecular Characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. **Acta Bioch., Bioph. Sin.**, v. 36, p.111-117, 2004.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. The Families of Flowering Plants: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval (1992) Version: 14<sup>th</sup> December 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.

WEBB, J. S.; THOMPSON, L. S. JAMES, S.; CHARLTON, T.; KOCH, B. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **J Bacteriol**, v. 185, p. 4585-4592, 2003.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin carbohydrate recognition. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WENTWORTH, J. S.; AUSTIN, F. E.; GARBER, N.; GILBOA – GARBER, N.; PATERSON, C. A.; DOYLE, R. J. Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 4, p. 94-104, 1991.

WINGENDER, J.; NEU, T.; FLEMMING, H. What are bacterial extracellular substance. **Microbiol Ext Polym**, p. 1-19, 1999.

WOZNIAK, D. J.; WYCKOFF, T. J. O.; KEYSER, R.; STARKEY, M.; PARSEK, M. R. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA 14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 7907-7912, 2003.

WU, L.; HOLBROOK, C.; ZABORINA, O.; ROCHA, F.; CHANG, E.; ALVERDY, J. *Pseudomonas aeruginosa* express a lethal virulence determinant, the PA – I lectid / adhesion, in the intestinal tract of stressed host. **Ann Surg**, v. 238, p. 754-764, 2003.

XU, Z. H.; SUN, J.; XU, R. S.; QIN, G. W. Casbane diterpenoidas from *Euphorbia ebracteolata*. **Phytochemistry** v. 49, p. 149-151, 1998.

ZAVODNIK, N. Seasonal variations in the rate of photosynthetic activity and chemical composition of the littoral seaweeds *Ulva rigida* and *Porphyra leucostica* from the North Adriatic. **Bot. Mar.** **30**: 71-82, 1987.