

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

**FABIANO FAZANARO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERFERÊNCIA DE LECTINAS VEGETAIS E DO  
DITERPENO CASBANO ISOLADO DE *Croton nepetaefolius* SOBRE O  
CRESCIMENTO DE FORMAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Pseudomonas*  
*aeruginosa***

**SOBRAL – CE**

**2010**

FABIANO FAZANARO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERFERÊNCIA DE LECTINAS VEGETAIS E DO  
DITERPENO CASBANO ISOLADO DE *Croton nepetaefolius* SOBRE O CRESCIMENTO  
DE FORMAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES 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. Edson Holanda  
Teixeira

SOBRAL – CE  
2010

FABIANO FAZANARO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERFERÊNCIA DE LECTINAS VEGETAIS E DO  
DITERPENO CASBANO ISOLADO DE *Croton nepataefolius* SOBRE O CRESCIMENTO  
DE FORMAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

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

Áreas de concentração: Biotecnologia/Microbiologia/Bioquímica

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2010

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira – Orientador  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos  
Universidade Estadual Vale do Acaraú

À Regina, meu grande amor e companheira de todos os momentos.

Aos meus pais, Paulo e Maria Leonor, por todos seus esforços e ensinamentos para que eu me tornasse o que sou hoje.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu amigo Cícero Silvério de Paiva Neto e toda sua família pelo apoio dado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira pela orientação deste trabalho e também por sua paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Sebastião Diógenes, sempre disposto a ajudar e ensinar.

Ao Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos, pela doação do diterpeno casbano e pela colaboração na elaboração científica deste trabalho.

Aos amigos doutorandos do laboratório, Víctor, Theodora e Vassiliepe, pela ajuda, orientação, correções e amizade.

Aos colegas de turma: Ticiania, Sâmia, Cynara, Fábio, Niedja, Isana e Luís Edmundo, por trilharmos essa longa caminhada juntos; Em especial ao Togashi por partilharmos muitos experimentos e ao Mayron, sempre disposto a ajudar da melhor maneira possível.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Bioquímica de Sobral - LIBS, Fábio, Togashi, Luíz, Francisca, Tiago, Mauro, Cinara, Rafaela, Érica, Ellen, Flávio, Janaina e Pedro.

Ao Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, em particular ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, por sempre ceder generosamente as lectinas e dar subsídios para realizarmos nossas pesquisas.

Ao Dr. Ivano de Filipis do ICCQ da Fiocruz, por ceder à cepa usada neste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pelo empenho na formação científica de seus pós-graduandos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Ceará – FUNCAP – pelo apoio financeiro a este projeto.

À Universidade Federal do Ceará, em particular a Faculdade de Medicina de Sobral, que me acolheu desde minha chegada em Sobral.

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia de Sobral.

“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## RESUMO

Este trabalho demonstra as atividades biológicas de lectinas isoladas de sementes de *Vatairea macrocarpa* e de *Vatairea guianensis* e do diterpeno casbano, isolado do *Croton nepetaefolius*, sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), causadora de otite externa. Comparou-se a ação *in vitro* das duas lectinas e do diterpeno casbano sobre culturas de *P. aeruginosa*. As células bacterianas foram testadas tanto em sua forma planctônica como na de biofilme. As lectinas testadas não foram capazes de inibir o crescimento da forma planctônica e a formação de biofilme da *P. aeruginosa* nas condições experimentais. Por outro lado, o diterpeno casbano foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* na forma planctônica, nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL. Entretanto, não foi observada inibição da formação do biofilme da *P. aeruginosa* nas concentrações utilizadas neste estudo. O diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius* poderá ser utilizado, após a realização de outros estudos, como ferramenta biotecnológica antimicrobiana sobre as formas planctônicas de *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Lectina; diterpeno; *Pseudomonas aeruginosa*

## ABSTRACT

This work shows the biological activities of lectins isolated from *Vatairea macrocarpa* and *Vatairea guianensis* seeds and the diterpene casbane, isolated from *Croton nepetaefolius* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) that causes otitis externa. The *in vitro* activity of the two lectins and casbane diterpene were compared on cultures of *P. aeruginosa*. The bacterial cells were tested such in planktonic as in biofilm forms. The lectins tested were not capable to inhibit the growth and biofilm production of *P. aeruginosa* in the experimental conditions. On the other hand, the casbane diterpene was capable to inhibit the growth of planktonic forms of *P. aeruginosa* at the concentrations of 500, 250 and 125 µg/mL. However, the inhibition of biofilm production was not observed at the same concentrations. The casbane diterpene isolated from *Croton nepetaefolius* can be used, after the realization of other studies, as an antibiotic biotechnological tool on planktonic forms of *P. aeruginosa*.

Keywords: Lectin; diterpene; *Pseudomonas aeruginosa*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Classificação das lectinas .....	16
FIGURA 2	Arbustos de <i>Croton nepetaefolius</i> .....	20
FIGURA 3	Diterpenos isolados de <i>Croton</i> .....	21
FIGURA 4	Estruturas de diterpenos casbano isolados da família Euphorbiaceae ..	24
FIGURA 5	Espectro na região do IV de (1) .....	27
FIGURA 6	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de (1) .....	27
FIGURA 7	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de (1) .....	28
FIGURA 8	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de (1) .....	28
FIGURA 9	Espectro de massas de (1) .....	29
FIGURA 10	Estágios da formação do biofilme .....	33
FIGURA 11	Atividade hemaglutinante das lectinas .....	46
GRÁFICO 1	Ensaio da Concentração Inibitória Mínima da lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
GRÁFICO 2	Ensaio da Concentração Inibitória Mínima da lectina de <i>Vatairea guianensis</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
GRÁFICO 3	Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do diterpeno casbano sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	48
GRÁFICO 4	Produção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> após 12 horas, com diferentes meios de cultivo .....	49
GRÁFICO 5	Produção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> após 24 horas, com diferentes meios de cultivo .....	49
GRÁFICO 6	Produção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> na presença da lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i> .....	50
GRÁFICO 7	Produção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> na presença da lectina de <i>Vatairea guianensis</i> .....	50
GRÁFICO 8	Produção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> na presença do composto diterpeno casbano .....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas utilizadas .....	17
TABELA 2	Correlação entre as espécies e as atividades farmacológicas de diterpenos casbano isolados da família Euphobiaceae relatados na literatura .....	23
TABELA 3	Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de (1) em $\text{CDCl}_3$ . .....	26
TABELA 4	Critérios para diagnóstico das infecções causadas por biofilmes .....	34
TABELA 5	Lectinas, siglas e respectivas referências dos trabalhos que citam o isolamento .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmpC	Resistência a ampicilina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Meio de cultura de infusão de cérebro e coração
BioMol-Lab	Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas da UFC
BSA	Albumina sérica bovina
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
O. D.	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GlcNAc	N-acetilglicosamina
LB	Meio de cultura de Luria-Bertani
LCM	Microscopia confocal a <i>laser</i>
MIC	Concentração Inibitória Mínima
Neu5Aca(2,3)	Ácido alfa-2-3 N-acetilneuramínico
Neu5Aca(2,6)	Ácido alfa-2-6 N-acetilneuramínico
OMS	Otite Média Serosa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogênico
PHA	Aglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSC	Rinossinusite crônica
RT-PCR	Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
SPE	Substância polimérica extracelular
TSB	Caldo de soja tríptica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VGL	Lectina de <i>Vatairea guianensis</i>
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	14
1.1	Lectinas .....	15
1.1.1	Principais fatos no desenvolvimento da lectinologia .....	15
1.1.2	Tendências na classificação das lectinas .....	15
1.1.3	Ocorrência das lectinas nos seres vivos .....	18
1.2	Diterpeno casbano .....	19
1.2.1	Determinação estrutural do diterpeno casbano .....	25
1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
1.4	Infecções otológicas com envolvimento de <i>P. aeruginosa</i> .....	31
1.5	Biofilmes .....	32
1.6	Biofilmes em otorrinolaringologia .....	35
1.6.1	Biofilmes na rinosinusite crônica (RSC) .....	36
1.6.2	Biofilmes nas tonsilites e adenóides .....	36
1.6.3	Biofilmes em dispositivos médicos .....	36
1.6.4	Biofilmes e otites .....	38
2	Objetivos .....	40
2.1	Geral .....	40
2.2	Específicos .....	40
3	Materiais e métodos .....	41
3.1	Lectinas utilizadas .....	41
3.2	Diterpeno casbano .....	41
3.2.1	Coleta e identificação do material vegetal .....	41
3.2.2	Procedimentos experimentais gerais .....	41
3.2.3	Isolamento dos constituintes químicos fixos do extrato etanólico do caule de <i>Croton nepetaefolius</i> .....	42
3.3	Bactérias .....	42
3.4	Determinação da atividade hemaglutinante .....	42
3.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....	43
3.6	Ensaio da formação de biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura .....	44

3.7	Ensaio de inibição da formação do biofilme bacteriano em placas de poliestireno usando lectinas e diterpeno casbano .....	44
3.8	Análises estatísticas .....	45
4	Resultados .....	46
4.1	Atividade hemaglutinante .....	46
4.2	Concentração Inibitória Mínima .....	46
4.3	Ensaio da formação do biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura .....	48
4.4	Atividade biológica das lectinas e do diterpeno casbano sobre biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	50
5	Discussão .....	52
6	Conclusão .....	56
7	Referências bibliográficas .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Novas fontes de produtos antimicrobianos necessitam ser identificadas devido à existência e constante evolução de microorganismos resistentes, a emergência de novas doenças e a toxicidade exibida por alguns antimicrobianos (SIMÕES *et al.*, 2009).

O uso de substâncias naturais com finalidades terapêuticas é uma tradição milenar presente em diversas culturas. O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e, por um longo tempo, minerais, plantas e produtos animais foram as principais fontes de drogas (BAJPAI *et al.*, 2008). Das drogas prescritas mundialmente, cerca de 25% provêm de plantas, 121 dos compostos ativos são de uso corriqueiro. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente originárias de plantas, como, por exemplo: digoxina de *Digitalis* spp, vincristina de *Catharanthus roseus*, entre outras (RATES, 2001). A grande biodiversidade de espécies vegetais presentes no Brasil constitui uma de suas maiores riquezas e se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (KORDALI *et al.*, 2008). A utilização de plantas no tratamento de diversas enfermidades, infecciosas ou não, é, na prática, bastante utilizada (MACIEL; VIANA, 2005). O estudo das bases científicas deste uso tem despertado o interesse da comunidade científica (SANTOS *et al.*, 2008). Apesar do aumento dos estudos sobre plantas medicinais, somente de 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Considerando a grande biodiversidade do Nordeste brasileiro, esse número poderia ser bem maior (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Neste sentido, com o intuito de avaliar cientificamente o uso de substâncias de origem vegetal como possíveis medicamentos antimicrobianos, o presente trabalho avaliou a atividade biológica de duas lectinas vegetais (VML e VGL) extraídas de *Vatairea macrocarpa* e *Vatairea guianensis*, respectivamente, e do diterpeno casbano extraído de *Croton nepetaefolius* sobre o crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa causadora de otite externa), tanto na forma planctônica através de ensaio de MIC como na forma de biofilme.

Na área de otorrinolaringologia sabe-se hoje que, na prática clínica, que patologias de orelhas, nariz e garganta antes facilmente tratadas têm se tornado mais resistentes aos tratamentos habituais (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Tal fato pode ser devido ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes ao antibiótico e ou a associação bacteriana na

forma de biofilmes. Diversos trabalhos demonstram a presença de cepas resistentes e de biofilmes de *P. aeruginosa* associados a otites (AH-TYE, 2001, OXLEY *et al.*, 2007, BARAKATE *et al.*, 2007; BERNSTEIN *et al.*, 2007).

## 1.1 Lectinas

### 1.1.1 Principais fatos no desenvolvimento da lectinologia

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 em 1907 iniciou novos estudos utilizando aglutininas vegetais como ferramentas para o descobrimento dos grupos sanguíneos A, B e O. 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.

### 1.1.2 Tendências na classificação das lectinas

Peumans e Van Damme (1995) definem lectinas como proteínas de origem não imune, possuindo pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidrato e capaz de ligar-se a mono ou oligossacarídeos específicos.

Fundamentado nas características estruturais observadas, as lectinas foram, divididas, conforme Peumans e Van Damme (1995; 1998) em quatro grupos principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são definidas como proteínas compostas exclusivamente de um único sítio ligante a carboidratos e, por causa de sua natureza monovalente, não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Como exemplo, podemos citar as proteínas monoméricas das orquídeas.

As hololectinas são também constituídas, por sítios ligantes a carboidratos, possuindo, dois ou mais destes sítios idênticos ou homólogos. A este grupo pertencem muitas lectinas de plantas, como a Concanavalina A (ConA), que apresentam múltiplos domínios ligantes e são, portanto, potencialmente capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.

As quimerolectinas, como a ricina, compreendem todas as lectinas que possuem além do sítio de ligação a carboidratos, uma região, apresentando atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida, agindo independentemente dos sítios ligantes de carboidratos, e que, dependendo do número de sítios ligantes a carboidratos, podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas. As superlectinas possuem dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares distintos (Figura 1).

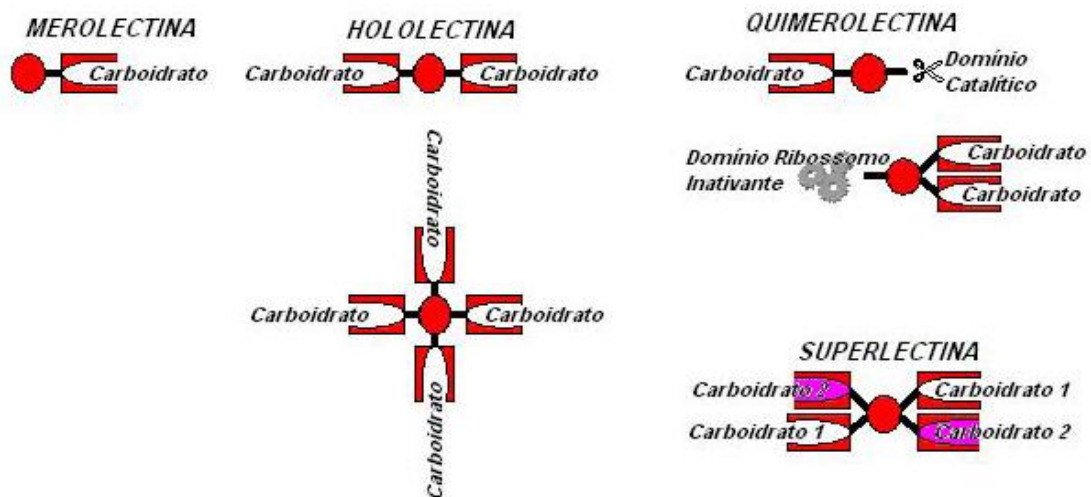


Figura 1 – Classificação das lectinas. A classificação ilustrada acima foi proposta por Peumans e Van Damme (1995; 1998). Fonte: TEIXEIRA (2005).

As lectinas, principalmente as de plantas superiores, são classificadas de acordo com suas especificidades por carboidratos (monossacarídeos, oligossacarídeos e derivados). O estabelecimento desta especificidade através da técnica de inibição da atividade hemaglutinante proposta por Landsteiner (1907), tem sido de grande valia para os estudos bioquímicos e imunoquímicos até então realizados com estas proteínas. Para o desenvolvimento destes testes, soluções de diversos açúcares são utilizadas e comparadas até que finalmente determina-se a concentração mínima dos compostos inibidores. Apesar dos avanços nos estudos de afinidade das lectinas por oligossacarídeos, a classificação destas



proteínas ainda é feita pela especificidade por monossacarídeos estabelecida por Makela (1957): Grupo I - reúne as lectinas inibidas por L-fucose; Grupo II - engloba as lectinas com especificidade por galactose/N-acetilgalactosamina; Grupo III - constituído pelas lectinas específicas por glicose/manose; Grupo IV - encerra as lectinas com afinidade por idose/gulose/L-glicose e xilose. Outros grupos foram adicionados a esta classificação geral, incluindo as lectinas específicas por N-acetilglicosamina e ácido siálico. Algumas lectinas, por outro lado, exibem preferencialmente especificidade por estruturas complexas tais como glicoproteínas (Tabela 1).

Tabela 1 – Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas utilizadas.

ESPECIFICIDADE	LECTINAS
<b>Grupo Fucose</b>	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i>
<b>Grupo Galactose/N-acetilgalactosamina</b>	
Galactose >> GalNAc	Jacalina ( <i>Artocarpus integrifolia</i> )
Gal = GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal << GalNAc	Soja ( <i>Glycine max</i> )
<b>Grupo N-acetilglicosamina</b>	
GlcNAc	Germe de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )
(GlcNAc) <sub>n</sub>	<i>Urtica dioica</i>
<b>Grupo Manose</b>	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/Glicose	ConA ( <i>Canavalia ensiformis</i> )
Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
<b>Grupo Ácido Siálico</b>	
Ácido Siálico	Germe de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )
Neu5Acα(2,6)Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Acα(2,3)Gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
<b>Grupo de glicanos complexos</b>	
Especificidade com complexos conhecidos	PHA ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
Especificidade com complexos desconhecidos	<i>Euonymus europaeus</i>

Fonte: Adaptada de Peumans e Van Damme (1998).

### 1.1.3 Ocorrência das lectinas nos seres vivos

Apesar de terem sido encontradas originalmente em plantas, as lectinas ocorrem em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER *et al.*, 1981). Lectinas estão amplamente distribuídas na natureza e centenas destas moléculas têm sido isoladas de plantas, vírus, bactérias, invertebrados e vertebrados, incluindo mamíferos. Geralmente, as lectinas vegetais 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 principalmente, contêm pouca quantidade que não necessariamente são idênticas em estrutura ou especificidade a carboidratos com as lectinas de órgãos de armazenamento (RUDIGER, 1998).

A maneira mais usada para se identificar a presença de lectinas (hololectinas ou superlectinas) em uma preparação protéica é através da atividade hemaglutinante, onde hemácias humanas e/ou de diferentes animais são utilizadas. Eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas têm sido usados no sentido de aumentar a sensibilidade das hemácias à aglutinação, na medida em que, eventualmente, estes tratamentos expõem mais os receptores apropriados nas membranas das hemácias.

Quando Nowell (1960) descreveu a atividade mitogênica de lectinas sobre linfócitos humanos do sangue periférico, estudando a lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), um novo e importante ramo de pesquisa surgia tanto para a lectinologia quanto para a imunologia. 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 a sua ação biológica (TEIXEIRA, 2005).

Tais proteínas apresentam 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.*, 2007). Destaca-se aqui, dentre as várias atividades biológicas exercidas pelas lectinas, a atividade antibacteriana (ALENCAR *et al.*, 1999; HOLANDA *et al.*, 2005; RADIS-BAPTISTA *et al.*, 2006). Também foi demonstrada a capacidade de inibir a formação de biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Na ocasião, a qual se obteve a inibição da adesão de estreptococos orais responsáveis pela cárie à película adquirida dentária através da utilização de lectinas de algas marinhas.

## 1.2 Diterpeno casbano

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, Poraneroideae 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, 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, 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* 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 2).



Figura 2 – Arbustos de *Croton nepetaefolius*.

Estudos fitoquímicos realizados em espécies de *Croton* têm revelado a existência de metabólitos pertencentes a diversas classes, incluindo: alcalóides, flavonóides, terpenóides e taninos. Dentre estas classes, podemos destacar o isolamento de diterpenos com os mais variados esqueletos (Figura 3, p. 21 e 22).

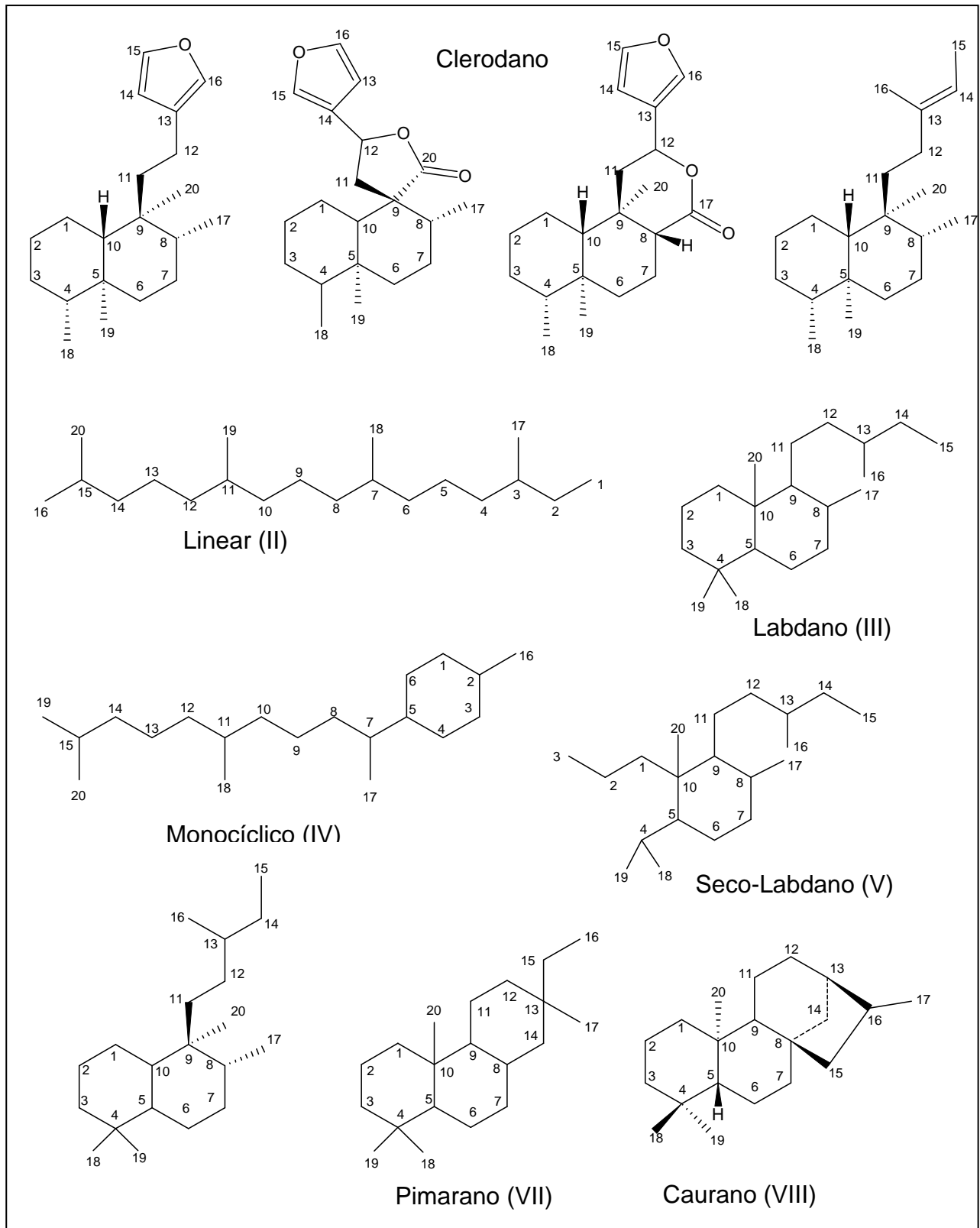
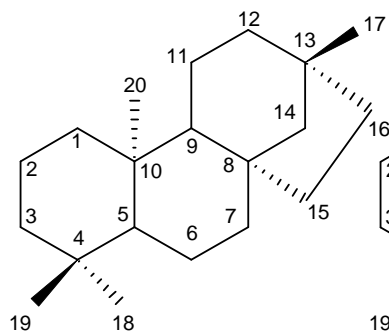
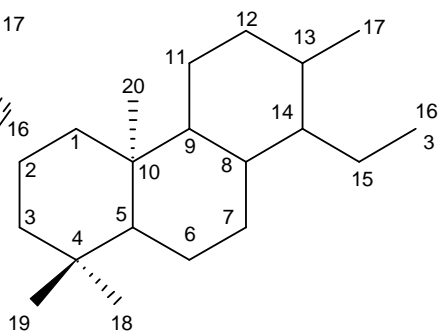


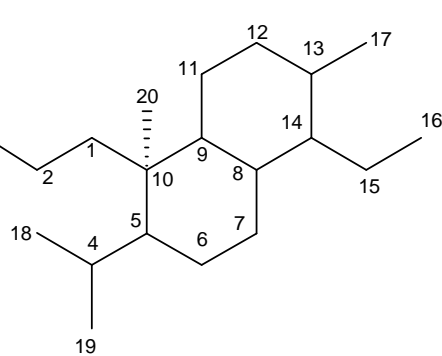
Figura 3 – Diterpenos aislados de *Croton*.



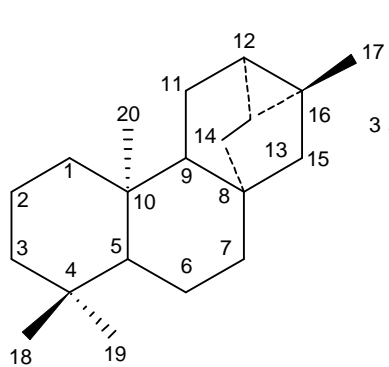
Beierano (IX)



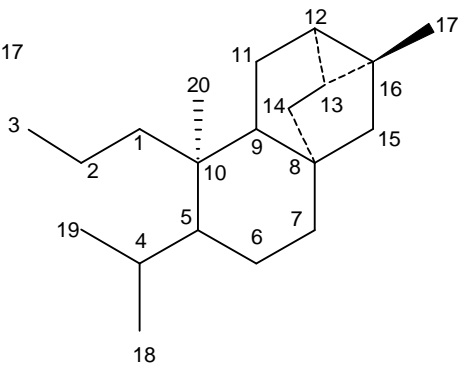
Cleistantano (X)



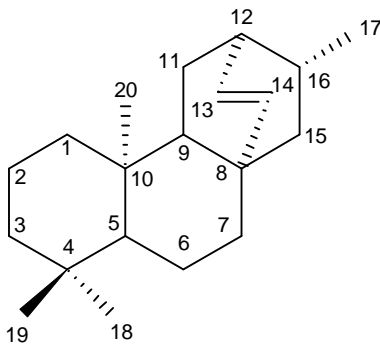
Seco-cleistantano (XI)



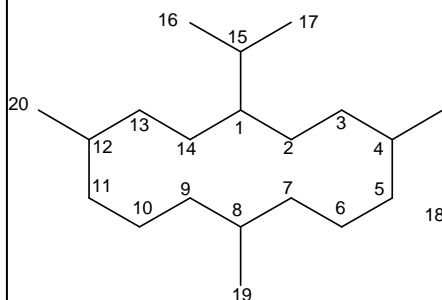
Traquilobano (XII)



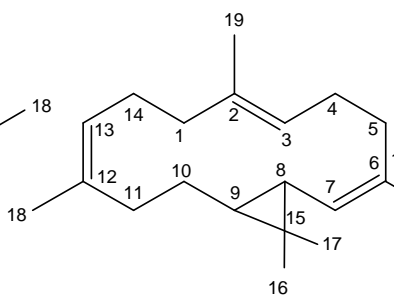
Seco-traquilobano (XIII)



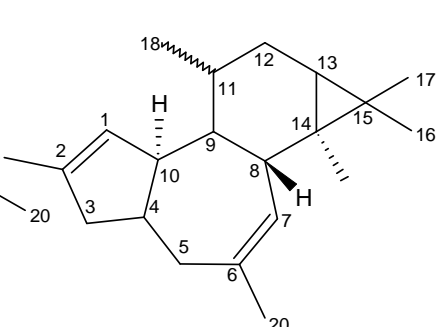
Atisano (XIV)



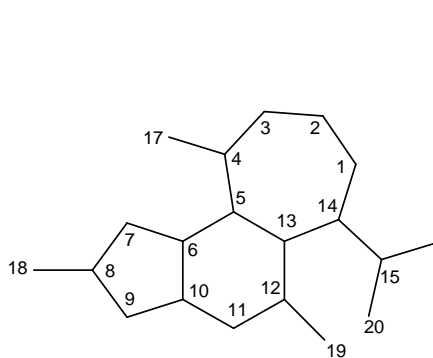
Cembrano (XV)



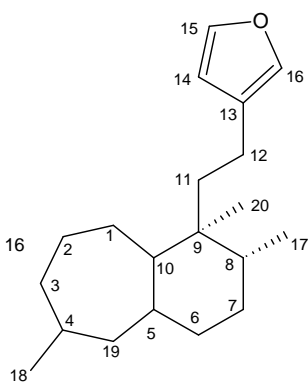
Casbano (XVI)



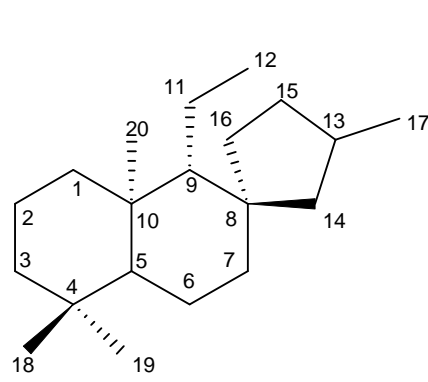
Tigiano (XVII)



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 esqueleto casbano (Figura 4, p. 24) isolados de espécies da família Euphorbiaceae (Tabela 2).

Tabela 2 – 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

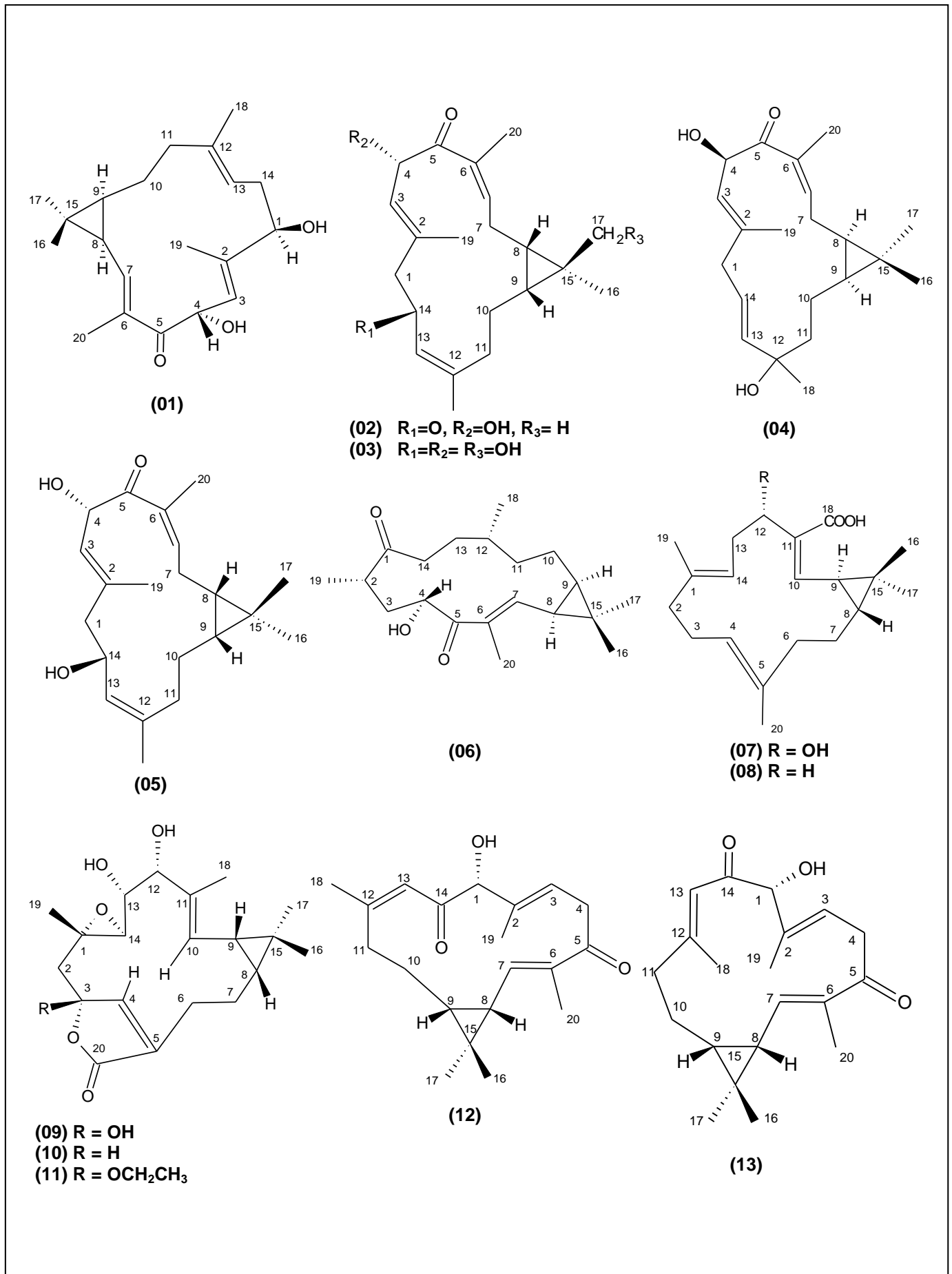


Figura 4 – Estruturas de diterpenos casbano isolados da família Euphorbiaceae.



### 1.2.1 Determinação estrutural do diterpeno casbano

O diterpeno casbano (**1**) 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 5 e 6, p. 27; 7 e 8, p. 28 e 9, p. 29) estão em acordo com valores da literatura (Tabela 3, p. 26) (SANTOS *et al.*, 2008).

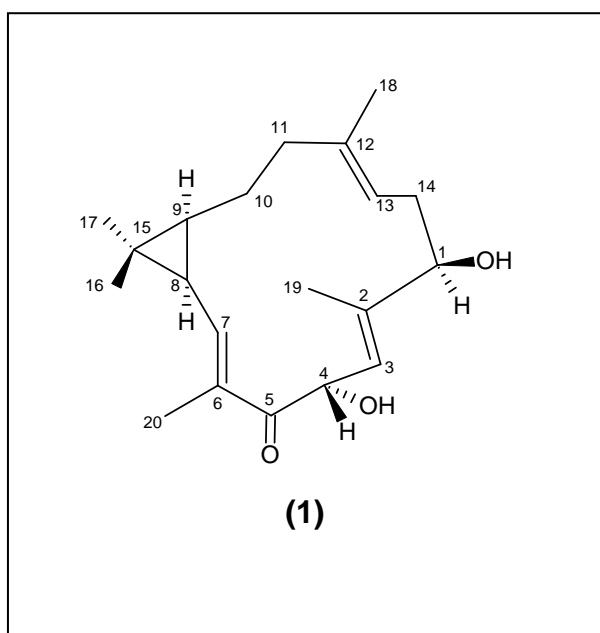


Tabela 3 - Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de (**1**) em CDCl<sub>3</sub>. Os deslocamentos químicos em  $\delta_C$  e  $\delta_H$  estão em ppm e constantes de acoplamento (*J*, entre parênteses) em Hz

<b>40</b>		
	$\delta_C$	$\delta_H$
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)
11	39,85	0,79 - 0,72 (m)
		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)

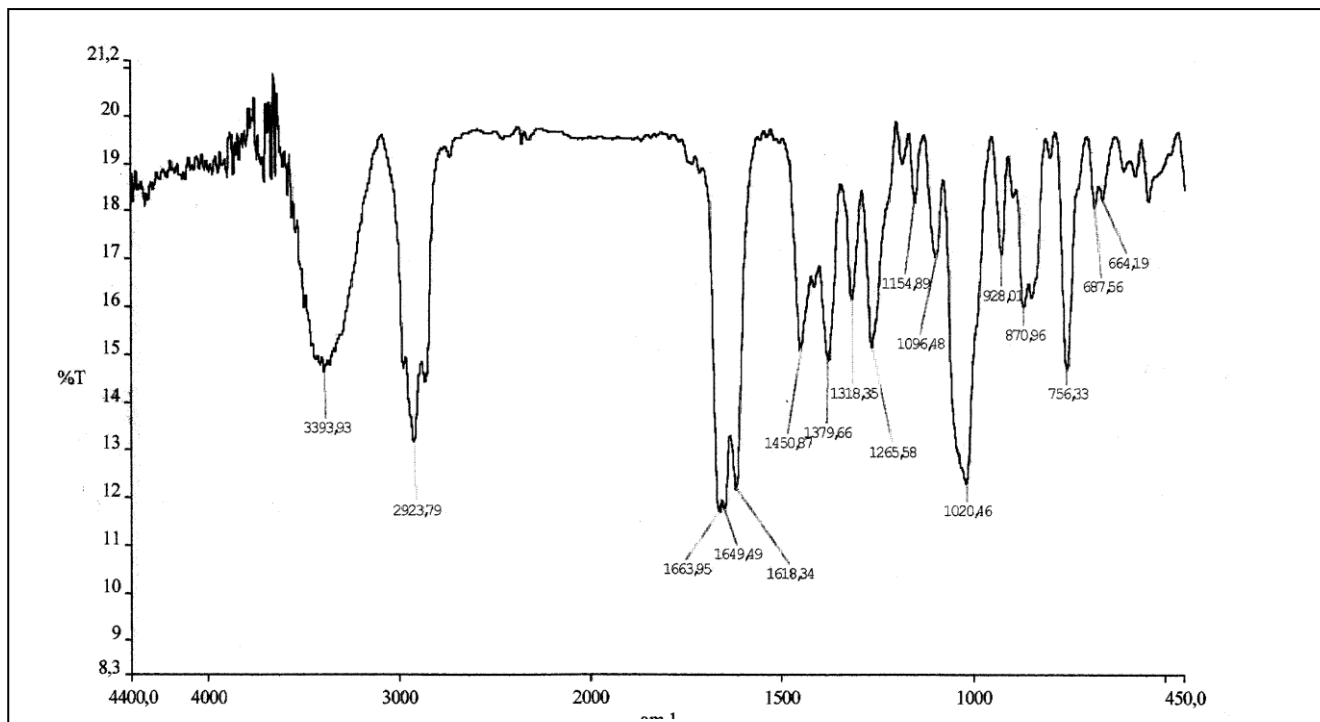


Figura 5 – Espectro na região do IV de (1).

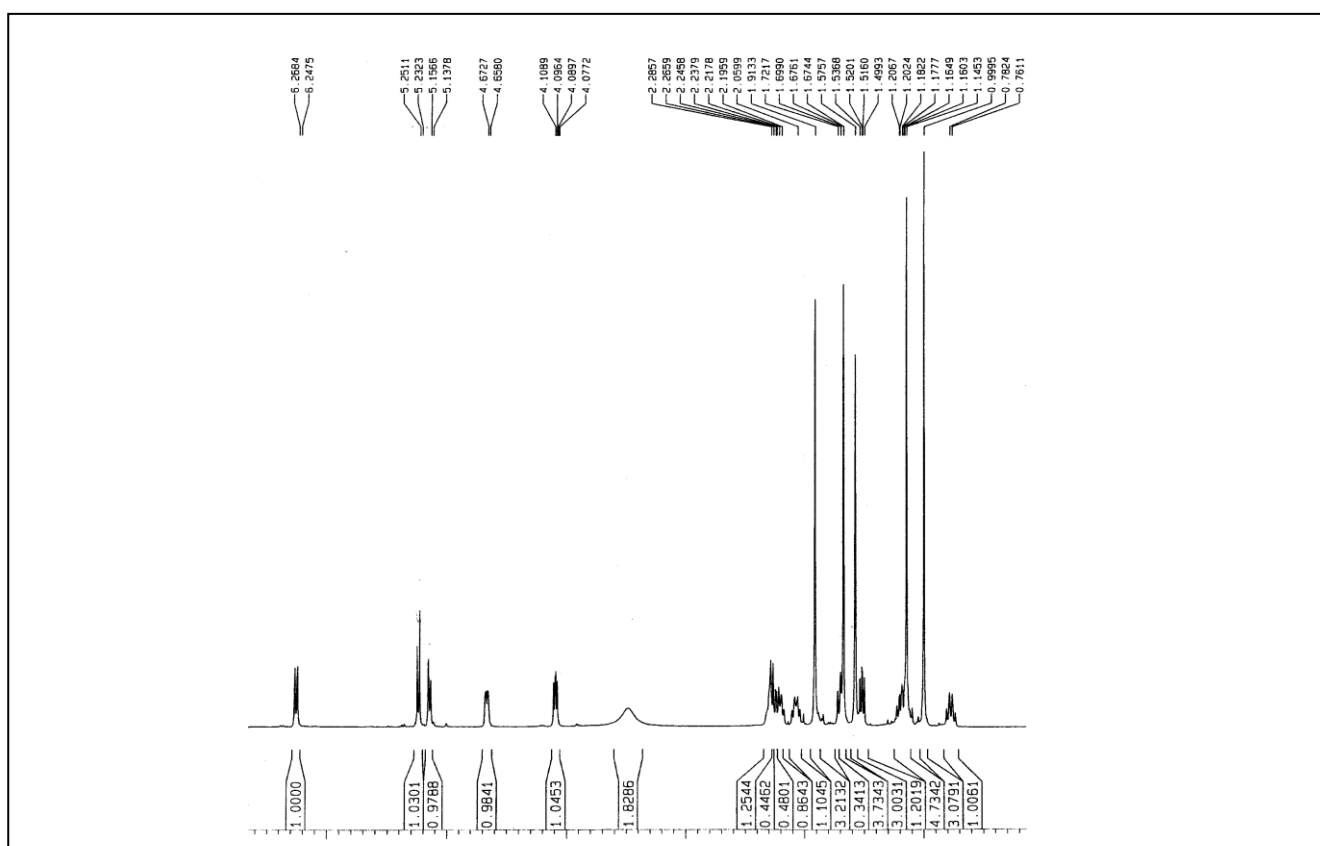


Figura 6 – Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de (1).

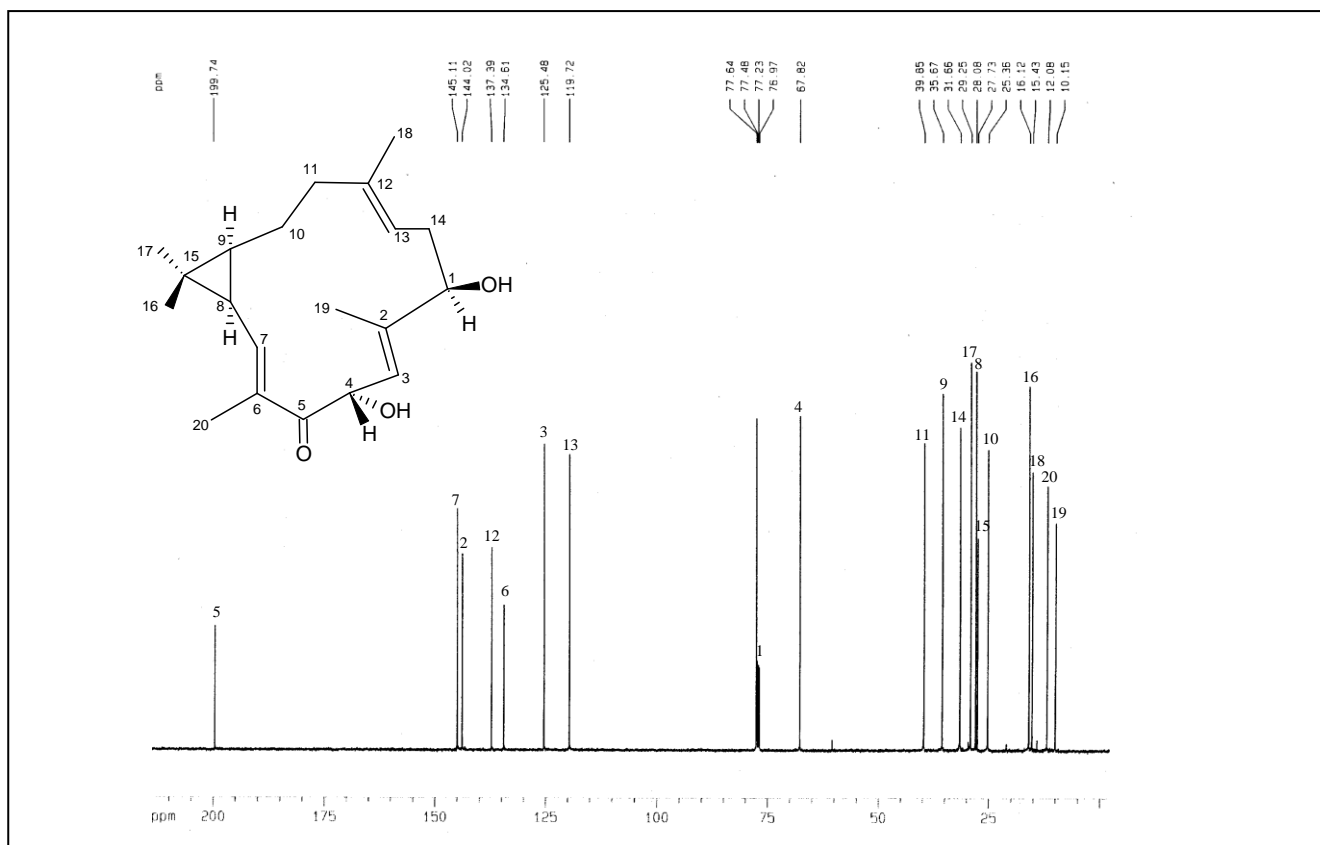


Figura 7 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de (1).

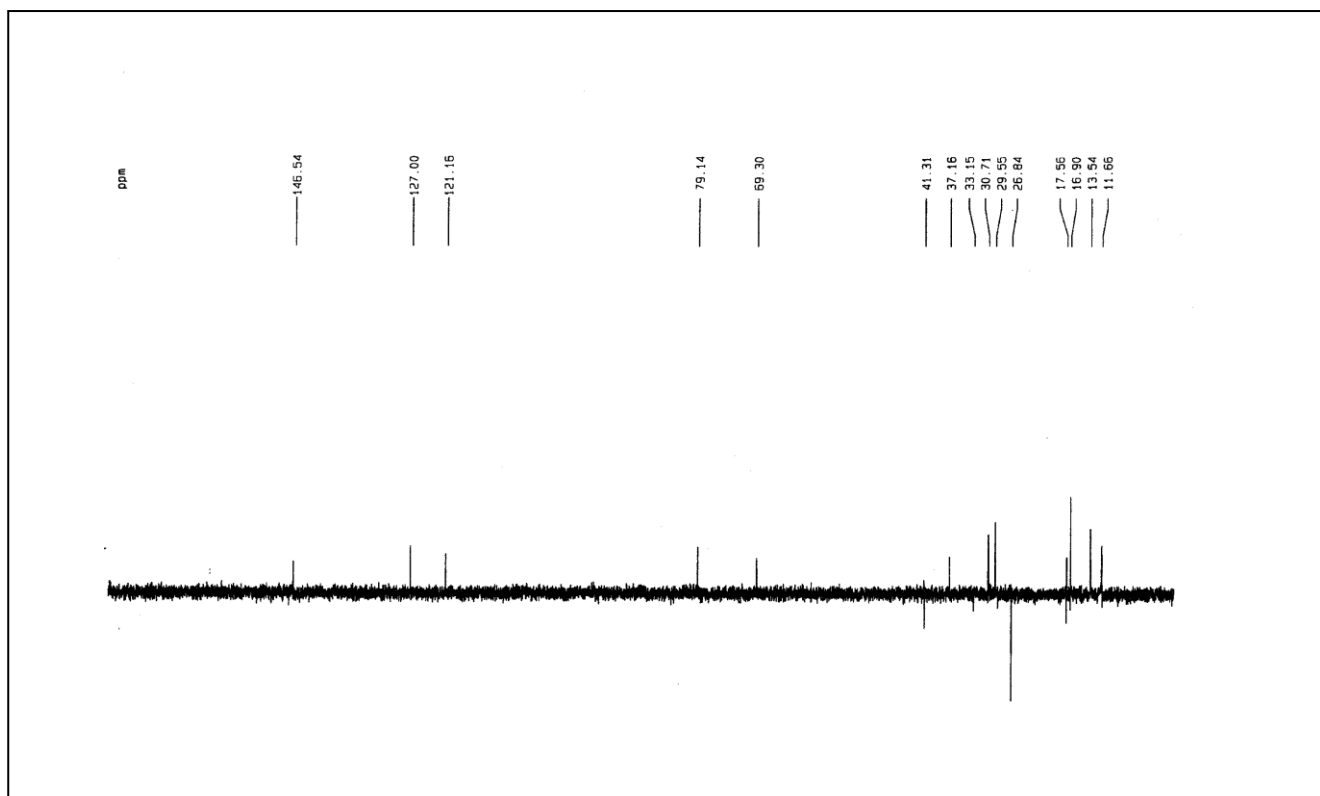


Figura 8 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135° (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de (1)

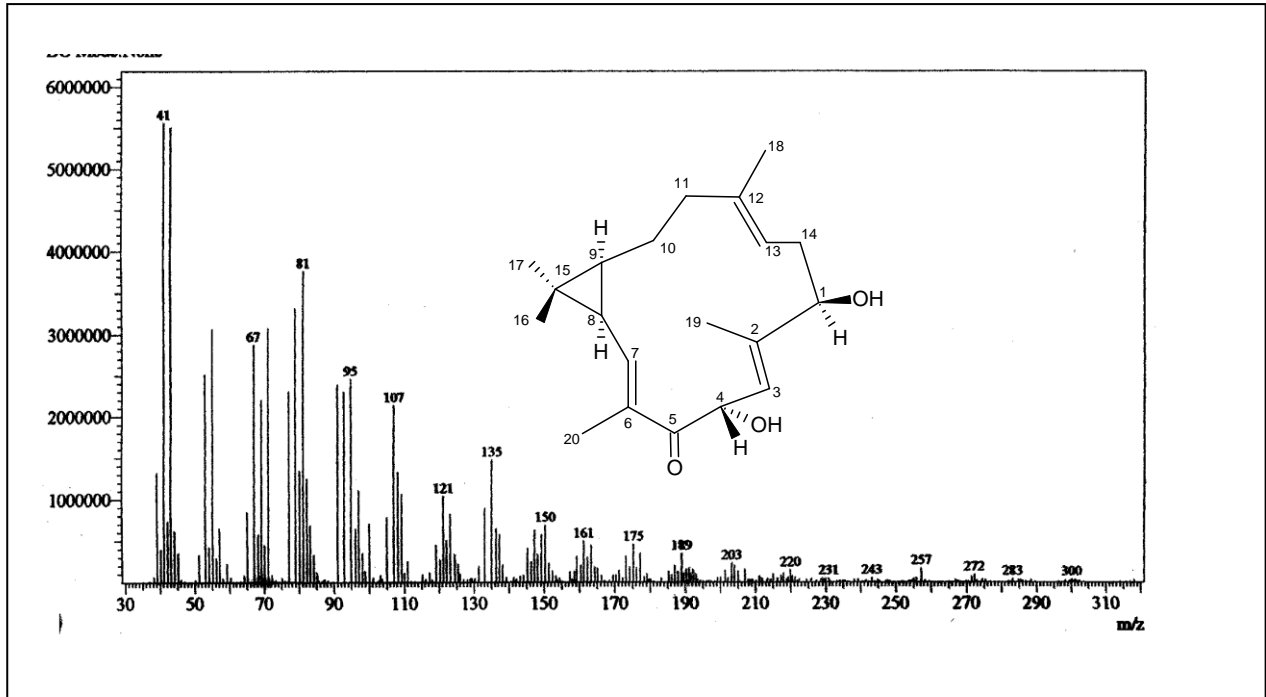


Figura 9 – Espectro de massas de (1).

### 1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é uma bactéria tipo bastonete reto ou ligeiramente curvo, móvel por um flagelo polar, gram-negativa, não fermentadora de carboidratos, aeróbia estrita, pertencente à família Pseudomonadaceae. É produtora de citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição ao oxigênio como aceptor final de elétrons, produzindo também arginina desidrolase e ornitina-descarboxilase. Pertence ao grupo fluorescente, produzindo pioverdina e piocianina (KONEMAN, 2001; FERREIRA, 2005).

Produz várias substâncias e fatores de virulência considerados responsáveis pelo aumento de colonização e infecção dos tecidos hospedeiros, incluindo lipopolissacarídeo, exotoxina A, leucocidina, viscosidade extracelular, proteases, fosfolipases, alginato, pili, neuraminidases, elastase, piocianinas, dentre outras (KONEMAN, 2001).

Podem ser identificadas pela morfologia da colônia, que são grandes, esverdeadas devido às piocianinas, com odor de uvas. Vale ressaltar que a *P. aeruginosa* é a única capaz de produzir piocianina, sendo esta característica a mais valiosa na sua identificação (KONEMAN, 2001). Além disso, crescem a 37 °C, alcalinizam acetamida, apresentam motilidade por meio do flagelo monopolar, desnitrificam nitratos e nitritos e apresentam atividade citocromo oxidase.

É o pseudomonídeo mais freqüentemente isolado de amostra clínicas, sendo freqüentemente encontrado em sítios onde existe a tendência de umidade, como pulmões, queimaduras, orelha externa, cateteres, trato urinário e feridas exsudativas. Pode assumir ainda formas multirresistentes de difícil erradicação clínica (KONEMAN, 2001; BERNSTEIN *et al.*, 2007).

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, 2003).

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.

A resistência bacteriana ao antibiótico também pode ser devida a formação de biofilme. Na otorrinolaringologia já é bem estabelecida a presença de *P. aeruginosa* sob a forma de biofilmes em casos de otites externas, médias crônicas, implantes cocleares e tubos de ventilação (VLASTARAKOS *et al.*, 2007; POST *et al.*, 2007; BERNSTEIN *et al.*, 2007; MACASSEY; DAWES, 2008; JARYSZAK *et al.*, 2009). Casos de otite externa maligna causados por *P. aeruginosa* resistentes ao ciprofloxacino também foram descritos (BERNSTEIN *et al.*, 2007).

#### **1.4 Infecções otológicas com envolvimento de *P. aeruginosa***

As otites externas são patologias bastante freqüentes, afetando 3 a 10% da população. Casos de otites externas malignas resistentes ao tratamento antibiótico também são descritos, o que preocupa visto ser uma doença de alta morbimortalidade (DA COSTA *et al.*, 2006; BERNSTEIN, 2007).

Do mesmo modo, as otites médias secretoras crônicas, as otites médias agudas recorrentes e as otites médias crônicas são doenças bastante freqüentes, principalmente nas crianças, levando à surdez de variados graus, risco de complicações graves e a um gasto anual enorme para os cofres públicos para seu tratamento (DA COSTA *et al.*, 2006). Casos refratários aos tratamentos convencionais são facialmente encontrados sendo relatados na literatura.

Também o uso de dispositivos médicos como implantes cocleares e tubos de ventilação não estão isentos de complicações. Dentre estas complicações está a infecção crônica que, se não responsiva ao tratamento antibiótico convencional, implica na remoção cirúrgica do dispositivo (MAH; O'TOOLE, 2001).

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de biofilmes bacterianos como agentes causadores e complicadores destas doenças (CHOLE; FADDIS, 2002; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2006; POST *et al.*, 2007; MACASSEY; DAWES, 2008; JARYSZAK *et al.*, 2009; SAUNDERS *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009). Este fato preocupa o

meio médico, pois os biofilmes são mais resistentes aos tratamentos médicos convencionais, nem sempre se conseguindo a cura (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Estima-se que os biofilmes estejam associados a 65% das infecções nosocomiais e crônicas e que o tratamento destas infecções ultrapasse o custo anual de um bilhão de dólares por ano (MAH; O'TOOLE, 2001).

Desta forma, a descoberta de novas substâncias que possam ser usadas para o tratamento das patologias associadas a cepas resistentes aos antibióticos convencionais e aos biofilmes passam a ter destaque no meio científico e clínico.

## 1.5 Biofilmes

Historicamente as bactérias têm sido estudadas como organismos isolados conhecidos como formas planctônicas, entretanto torna-se claro agora que a maioria das bactérias existe na forma de complexas comunidades, aderidas a superfícies conhecidas como biofilmes.

Biofilmes são comunidades bacterianas, heterogêneas e organizadas, embebidas em uma matriz rica em polissacarídeos, ácidos nucléicos e proteínas, conhecida com substâncias poliméricas extracelulares (SPEs), aderidos à uma superfície inerte ou mucosa (COSTERTON *et al.*, 1999). Vale ressaltar, entretanto, que os biofilmes não são apenas um grupo de bactérias embebidas pela matriz de SPEs, mas sim complexas estruturas tridimensionais conforme mostram os estudos de microscopia confocal a laser (LCM) (POST, *et al.*, 2007).

A formação dos biofilmes envolve um processo dinâmico de cinco passos: primeiro ocorre à atração reversível da bactéria pela superfície, através de quimiotaxia e forças eletrostáticas. Em segundo ocorre a adesão irreversível através de proteínas de superfície das bactérias. O terceiro passo envolve a agregação bacteriana com formação das SPEs. No quarto plano ocorre a maturação da estrutura do biofilme com crescimento e reprodução celular determinando um microambiente favorável, determinado pelas SPEs, pelas células vizinhas e pela presença de canais de água que representam um sistema circulatório primitivo que ajuda na homeostasia do biofilme. Por fim, no quinto passo há a dispersão bacteriana na qual as bactérias se destacam do biofilme e migram para outras regiões ou morrem (STOODLEY *et al.*, 2002) (Figura 10, p. 33).



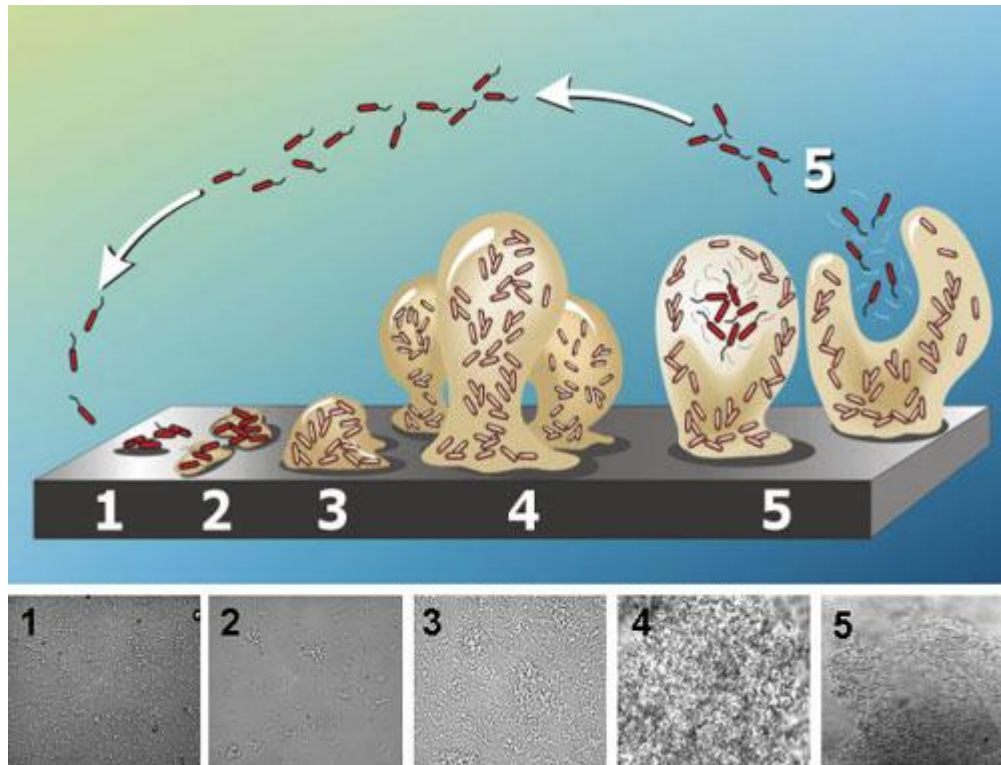


Figura 10 – Estágios da formação do biofilme.

Na forma de biofilme as bactérias adquirem mecanismos tanto de resistência a agressões não biológicas como radiação, alterações mecânicas, temperatura e resistência a antibióticos, como também à agressões de origem biológica (MAH; O'TOOLE, 2001). Estima-se que a resistência bacteriana a antibióticos torna-se 10 a 1000 vezes maior quando estas se encontram na forma de biofilmes. Além disso, os biofilmes apresentam diversos microambientes, como variações de pH, nutrientes e potencial oxidativo, além de complexa estrutura de canais e sinais biomoleculares. Também podem apresentar diversas cepas de um mesmo microorganismo e até organismos de espécies diferentes. Além disso, são ambientes propícios para a transferência horizontal de DNA o que permite maior variabilidade genética e chance de mutações adaptativas (HALL-STOODLEY *et al.*, 2006; POST *et al.*, 2007; VLASTARAKOS *et al.*, 2007).

Alterações fenotípicas nos biofilmes são determinadas por um sistema de comunicação interbacteriano denominado de *quorum sensing*, que utiliza pequenas moléculas difusíveis sinalizadoras. Além disso, os biofilmes apresentam uma taxa de metabolismo diminuída em relação às bactérias livres, que facilita sua sobrevivência e aumenta sua resistência à drogas (MAH; O'TOOLE, 2001).

Os biofilmes estão implicados na etiologia de várias doenças crônicas, dentre elas a periodontite, fibrose cística, infecções crônicas do trato urinário inferior, infecções secundárias ao uso de cateteres e próteses, rinosinusite crônica, tonsilite crônica, otite média crônica, dentre outras (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Parsek e Singh (2003), propuseram critérios para o diagnóstico clínico das infecções causadas por biofilmes (Tabela 4).

Tabela 4 – Critérios para diagnóstico das infecções causadas por biofilmes.

<b>Ordenamento</b>	<b>Critério</b>
A	Bactéria patogênica associada a uma superfície
B	Exame direto do tecido infeccionado revelando células agregadas e envoltas por matriz
C	Infecção restrita a um sítio em particular do hospedeiro
D	Resistência ao antibiótico indicado mesmo com antibiograma demonstrando susceptibilidade à forma planctônica
E	Cultura negativa mesmo nos casos de forte suspeita clínica
F	Incapacidade de <i>clearance</i> por parte do hospedeiro

Atualmente, tem se utilizado técnicas de RT-PCR e de hibridização fluorescente (FISH) para tentar comprovar a presença de biofilmes causadores de doença *in vivo* (HALL STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Quanto ao tratamento dos biofilmes causadores de patologia humana, o uso de antibióticos sistêmicos é preconizado, porém sabe-se que os biofilmes expressam uma resistência maior ao seu uso. Tal fato parece ser devido ao baixo metabolismo bacteriano nos biofilmes, além de uma taxa de replicação menor e à proteção conferida pelas SPEs. Como a maioria dos antibióticos disponíveis age sobre os níveis moleculares, celulares ou organismal, eles perdem eficácia contra este nível comunitário de bactérias.

Avanços no conhecimento das bases genéticas e moleculares dos biofilmes permitirão o desenvolvimento de novas drogas com a finalidade de controlar as doenças ocasionadas por biofilmes. Por exemplo, uma droga que atue impedindo a comunicação intercelular (*quorum sensing*) ou que iniba os genes de transcrição ou os genes responsáveis pela aderência do biofilme poderia ser benéfica nesse sentido. Ainda mais, marcadores

poderiam ser descobertos no sentido de se fazer o diagnóstico da formação do biofilme ou até o uso de alguma substância que quebrasse a barreira de SPEs, favorecendo a penetração de antibióticos.

Dos antibióticos tradicionais, parece que aqueles que agem em contra células que não estão em crescimento (ex. fluorquinolonas) têm melhor atividade do que aqueles que somente são efetivos contra bactérias em crescimento (ex.  $\beta$ -lactâmicos). Alguns macrolídeos parecem impedir a formação do biofilme por uma propriedade outra que a bactericida (POST *et al.*, 2007; VLASTARAKOS *et al.*, 2007).

Antibióticos convencionais parecem ter melhor efeito quando usados conjuntamente com campos de corrente elétrica ou radiação ultrassônica (YOUNG *et al.*, 2010). Trabalhos têm demonstrado a eficácia maior dos antibióticos tópicos em comparação com os sistêmicos. Para situações persistentes o debridamento cirúrgico do tecido doente é a escolha (POST *et al.*, 2007; VLASTARAKOS *et al.*, 2007).

Em relação aos materiais médicos, como tubos de ventilação, parece que aqueles que têm sua superfície tratada com antibióticos (JANG *et al.*, 2010) ou silicone bombardeado por íons tem maior resistência à formação de biofilmes (SAIDI *et al.*, 1999; BERRY *et al.*, 2000). Nesse sentido, o desenvolvimento de novos materiais ou drogas, resistentes à formação de biofilmes, serão de grande valia.

## 1.6 Biofilmes em otorrinolaringologia

Em otorrinolaringologia tem sido claramente demonstrada a formação de biofilmes para os seguintes microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (POST *et al.*, 2007; VLASTARAKOS *et al.*, 2007; MACASSEY; DAWES, 2008).

Dada à propensão bacteriana em formar biofilmes e ao grande número de doenças associadas a sua formação não é de surpreender que os biofilmes tenham uma importante contribuição na gênese das doenças otorrinolaringológicas.

Tem sido observado na prática clínica que patologias de orelhas, nariz e garganta antes facilmente tratadas têm se tornado mais resistentes aos tratamentos habituais (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Poderia-se supor que tal fato se devesse ao uso indiscriminado de antibióticos que levaria ao aumento da resistência bacteriana. No entanto,

com os conhecimentos atuais sobre a presença de biofilmes na formação de doenças nas diversas áreas da medicina, podemos pensar que o fato das doenças estarem mais resistentes poderia também estar ligado à presença desses biofilmes.

#### 1.6.1 Biofilmes na rinosinusite crônica (RSC)

A natureza crônica, a resistência a antibióticos e os períodos de agudização, características da RSC, sugerem a presença de biofilmes na sua formação.

Vários estudos têm demonstrado a presença de biofilmes na mucosa tanto de modelos animais feitos com coelho (PERLOFF; PALMER, 2005) como de pacientes com RSC (HUNSAKER; LEID, 2008; YOUNG *et al.*, 2010).

#### 1.6.2 Biofilmes nas tonsilites e adenóides

Vários estudos demonstram a presença de biofilmes nos tecidos adenoideanos (COTICCHIA *et al.*, 2007) e tonsilite crônica (KANIA *et al.*, 2007).

#### 1.6.3 Biofilmes em dispositivos médicos

É demonstrada ainda a presença de biofilmes em cânulas de traqueostomia, tubos de intubação endotraqueal, tubos de ventilação otológicos, próteses ossiculares e em implantes cocleares (POST *et al.*, 2007; JARYSZAK *et al.*, 2009).

Como exemplo mais detalhado podemos citar tubos de ventilação, que são tubos de drenagem colocados na (e através da) membrana timpânica com o intuito de drenar secreções da orelha média e também de aerar a orelha média de pacientes que apresentam a tuba auditiva mal funcionante.

Timpanostomia com colocação de tubo de ventilação é o procedimento cirúrgico mais comumente executado nos Estados Unidos, atingindo o número de mais de um milhão de procedimentos por ano (OXLEY *et al.*, 2007; MALATY; ANTONELLI, 2008).

Existem tubos de curta, média e longa permanência ou definitivos. Os de curta duração são os mais utilizados e permanecem aderidos ao tímpano por um período médio de seis meses a um ano, quando geralmente são expulsos espontaneamente. Os de média duração permanecem por aproximadamente dezoito meses e os de longa permanência por vários anos ou definitivamente (HUNGRIA, 2000).

Há vários modelos no mercado, destacando-se os tipos Sheppard, Shea, Paparella, Armstrong, Donaldson e tubo em T. Quanto aos materiais geralmente são compostos de silicone, teflon ou fluoroplásticos (CAMACHO, 1999).

Como complicações e seqüelas do uso dos tubos podem ocorrer: timpanoesclerose, perfuração persistente da membrana timpânica, otorréia (infecção) e oclusão da luz de drenagem do tubo. Destas, a infecção com otorréia e a obstrução da luz são as mais freqüentes e tratadas através da instilação de gotas otológicas de ciprofloxacino associado ou não a corticóides. Por vezes o quadro infeccioso não regride, estando indicada a remoção do tubo (AH-TYE *et al.*, 2001; SIH *et al.*, 2003). Foi demonstrado que 83% das crianças apresentam pelo menos um episódio de otorréia em função da colocação do tubo de ventilação (AH-TYE *et al.*, 2001) e que 4% delas apresentam otorréia crônica. Estas complicações levam a um gasto ainda maior para o tratamento destes pacientes, além de poder prejudicar a audição e favorecer o aparecimento de otite média crônica, sendo às vezes necessária a remoção do tubo.

Assim como em outros materiais médicos, os biofilmes têm sido apontados como causadores da otorréia persistente e ou da obstrução do tubo pós timpanostomia com colocação do tubo de ventilação (OXLEY *et al.*, 2007).

A detecção direta de biofilmes bacterianos da orelha média de crianças portadoras de otite média serosa, submetidas à timpanostomia para colocação de tubo de ventilação foi feita através de microscopia de varredura confocal a laser e PCR, validando a hipótese de que a otite média crônica seja devida à formação de biofilmes (HALL-STOODLEY *et al.*, 2006).

Outro estudo demonstrou a presença de biofilmes diretamente nos tubos de ventilação extraídos de pacientes com otorréia refratária ao tratamento convencional (BARAKATE *et al.*, 2007), assim como também têm sido estudado os mecanismos de formação, do tratamento e da prevenção da formação de biofilmes em tubos de ventilação.

A presença de sangue humano foi apontada como indutora da formação de biofilmes em tubos de ventilação em um estudo que avaliou a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*, destacando a importância de se evitar o sangramento durante o ato operatório (MALATY; ANTONELLI, 2008).

Um estudo sobre o efeito de medicações otóticas sobre biofilmes em tubos de ventilação revelou que o uso de gotas antibióticas de ciprofloxacino, usualmente utilizadas para o tratamento clínico, diminuiu a infectividade do biofilme, porém sem conseguir erradicá-lo por completo, voltando inclusive a crescer após o término do uso da medicação (OXLEY *et al.*, 2007).

A resistência à formação de biofilmes em função do material do tubo também foi estudada. Foram avaliados tubos de silicone, silicone impregnado com prata, tubo fluoroplástico, fluoroplástico impregnado com prata e silicone bombardeado por íons, sendo a melhor resposta com este último (SAIDI *et al.*, 1999; BERRY *et al.*, 2000; TATAR *et al.*, 2005).

#### 1.6.4 Biofilmes e otites

As otites são processos infecciosos da orelha. De acordo com a localização anatômica do processo inflamatório classificam-se em otites externas e médias (PINHEIRO *et al.*, 2006).

Dentre as várias etiologias e denominações das otites externas, destacam-se aqui aquelas em que a *P. aeruginosa* está diretamente relacionada como fator etiológico: otite externa difusa aguda e a otite externa necrotizante (ou maligna) (DA COSTA *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2006). Resistência bacteriana associada ao uso da ciprofloxacina foi relatado em casos de otite externa maligna (BERNSTEIN *et al.*, 2007).

Já as otites médias compreendem um complexo de patologias que afetam a orelha média. Classificam-se em (CONSENSO BRASILEIRO DE OTITES, 1998; SIH *et al.*, 2003; DA COSTA *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2006):

- Otite média aguda, aguda supurativa e aguda recorrente;
- Otite média serosa (OMS ou secretora ou com efusão);
- Otite média crônica: simples, supurativa ou colesteatomatosa.

Vale ainda ressaltar as otites médias nas quais a *P. aeruginosa* está diretamente envolvida com a própria etiologia ou como complicação do uso de próteses para seu tratamento. Assim, destacam-se as agudas recorrentes e as serosas, visto possuírem indicações do tratamento cirúrgico através da timpanostomia com colocação do tubo de ventilação e as crônicas supurativas ou colesteatomatosas (DA COSTA *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2006).

Recentes estudos demonstraram a presença de biofilmes na orelha média de pacientes com otite média crônica com efusão e colesteatomatosas. Foi relatada a presença de biofilmes em 60% dos casos de OMC colesteatomatosa através de microscopia eletrônica de varredura em biópsias operatórias (SAUNDERS *et al.*, 2009). Número igual foi encontrado em outro estudo semelhante que utilizou a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia confocal a *laser* (LEE *et al.*, 2009). Para situações persistentes o debridamento cirúrgico do tecido doente é a escolha. Outros estudos de microscopia revelam a presença dos biofilmes nas otites médias crônicas supurativas e colesteatomatosas (CHOLE; FADDIS, 2002; HALL-STOODLEY *et al.*, 2006; MACASSEY; DAWES, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar *in vitro* a ação de lectinas vegetais isoladas de *Vatairea macrocarpa* e *Vatairea guianensis* e do diterpeno casbano extraído de *Croton nepetaefolius* sobre biofilmes e formas planctônicas de *P. aeruginosa* (cepa causadora de otite).

### 2.2 Específicos

- Avaliar a interferência das substâncias supracitadas sobre o crescimento planctônico da bactéria através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC);
- Induzir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* em placas de microtitulação;
- Testar diferentes meios de cultura na formação dos biofilmes;
- Avaliar a interferência das lectinas sobre a formação dos biofilmes;
- Avaliar a interferência do diterpeno casbano sobre a formação dos biofilmes;



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Lectinas utilizadas

O isolamento e purificação das lectinas utilizadas nos ensaios experimentais foram realizados 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 5).

Tabela 5 – Lectinas, siglas e respectivas referências dos trabalhos que citam o isolamento

Lectinas vegetais	Siglas	Especificidade	Referências
<i>Vatairea macrocarpa</i>	VML	Galactose	CAVADA <i>et al.</i> ,1998
<i>Vatairea guianensis</i>	VGL	Galactose	Dados não publicados

#### 3.2 Diterpeno casbano

##### 3.2.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

*C. nepetaefolius* (caule) foi coletado no município de Caucaia – CE. 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.

##### 3.2.2 Procedimentos experimentais gerais

O equipamento 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.

### 3.2.3 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.

### 3.3 Bactérias

Foi utilizada a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Este microorganismo foi escolhido por ter sido isolado a partir de uma infecção otológica humana (otite externa).

### 3.4 Determinação da atividade hemaglutinante

Os testes de atividade hemaglutinante, adaptados de Landsteiner (1907), foram realizados com hemácias humanas tipo O. O sangue coletado por punção periférica foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 1500 *xg*, 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 a 2% e tratadas com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína, 0,1 mg de enzima para 10 mL de sangue diluído a 2%).

Uma alíquota de 100 µL das lectinas foi diluída seriadamente em tubos de ensaio contendo tampão TRIS-NaCl 0,15 M. Terminadas as diluições, foram adicionados 100 µL da suspensão de hemácias a 2% (v/v). Os tubos foram deixados a 37 °C por 30 minutos e após esse tempo deixados a temperatura ambiente. As leituras foram realizadas após 1 e 12 horas do contato das lectinas com a solução de hemácias.

### 3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

De acordo com Arruda (2007), partindo de uma cultura estoque, em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) com 20% de glicerol, os microorganismos foram crescidos inicialmente em 10 mL de BHI por 24 horas a 37 °C com um inóculo de 100 µL. Após essa ativação inicial, a cultura foi renovada em mais 10 mL de BHI caldo estéril com inóculo 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 três vezes com NaCl 0,15 M e em seguida ajustada em espectrofotômetro para uma absorvância de 0,133, correspondente à turbidez do tubo 0,5 da escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Após o ajuste da concentração, prepararam-se soluções de lectinas e do diterpeno casbano antes da montagem da placa, em concentrações que variavam de 500 µg/mL a 7,8 µg/mL e mantidas em estoque até a utilização.

Em tubos tipo *eppendorf* foram distribuídas 100 µL das soluções de lectinas em cada uma das concentrações e após foi adicionado 100 µL da solução bacteriana ajustada. Após o inóculo os tubos foram incubados a 37 °C por 2 horas. Para os grupos controles das lectinas foi utilizado 100 µL NaCl 0,15 M e para o diterpeno casbano, água do tipo “Mili-Rios” e ainda foram utilizadas 100 µL de soluções de albumina sérica bovina (BSA) nas mesmas concentrações das lectinas. Passado esse tempo as soluções foram retiradas da estufa e realizado um inóculo de 4 µL das bactérias em contato com a lectina em placa de microtitulação (do tipo ELISA) contendo 200 µL de BHI, e realizada a primeira leitura no 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) a um comprimento de onda de 620 nm.

### **3.6 Ensaio da formação de biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura**

O ensaio de aderência da cepa bacteriana em placa de microtitulação foi realizado segundo a metodologia descrita por O'toole e Kolter (1998), com algumas adaptações. Para esse ensaio foram utilizados os seguintes meios: BHI (*Brain Heart Infusion*), LB (*Luria-Bertani*) e TSB (*Tryptic Soy Broth*). Após uma ativação inicial de uma cultura estoque, a mesma 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 no espectrofotômetro para uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (segundo a escala de MacFarland 0,5). Após o ajuste da concentração, foram distribuídos 200 µL dos meios de cultura puro ou esterilizado (BHI, LB e TSB) em placas de microtitulação, e inoculado em 4 µL de solução bacteriana previamente ajustada. Após a montagem, a placa foi incubada 37 °C, e realizadas a análise da formação de biofilmes nos tempos de 12 e 24 horas.

Passado esse tempo as placas foram retiradas da estufa e lavadas em equipamento automatizado por três vezes com água destilada (Biotrak II – Plate Wash) e depois adicionado 200 µL de metanol por 15 minutos em cada poço. Após a remoção do álcool e secagem da placa foi adicionado cristal violeta 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 para secagem. A seguir, 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 microplacas em um comprimento de onda de 595 nm (Biotrak II – Reader).

### **3.7 Ensaio de inibição da formação do biofilme bacteriano em placas de poliestireno usando lectinas e diterpeno casbano**

O ensaio de inibição da formação do biofilme em placas de poliestireno foi realizado segundo a metodologia descrita por O'Toole e Kolter (1998), com algumas adaptações. As soluções de cada lectina e do diterpeno casbano foram diluídas em concentrações seriadas de 1,0 mg/mL à 7,82 µg/mL. Após ativação, uma cultura estoque de *P. aeruginosa* 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 três vezes com NaCl 0,15 M, pH 7,2 e em seguida ajustada no espectrofotômetro para uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (0,133 nm). Após o ajuste da concentração, 50 µL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços da placa juntamente com 50 µL de solução de lectina nas concentrações descritas acima. Para o controle foi usado BSA nas mesmas concentrações. As placas foram então deixadas na estufa a 37 °C por 2 horas. Após este período as placas foram retiradas da estufa e os poços já utilizados foram completados com 100 µL de caldo BHI. Os poços restantes foram completados com 50 µL de diterpeno casbano nas concentrações descritas acima, juntamente com 100 µL de BHI e 50 µL da suspensão ajustada da bactéria. O controle foi feito utilizando-se solução de NaCl 0,15 M, pH 7,2 para as lectinas e água destilada para o diterpeno. As placas foram então incubadas a 37 °C por períodos de 24, 48 e 72 horas, sendo trocado o meio de cultura (BHI) a cada 24 horas. Passado esses tempos as placas foram retiradas da estufa e lavadas três vezes com água destilada (Biotrak II – Plate Wash). Depois adicionou-se em cada poço 200 µL de metanol por 15 minutos. O álcool foi então retirado e, após secagem da placa, foi adicionado 200 µL de cristal violeta por 15 minutos. Após a coloração com o cristal de violeta o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada sob temperatura ambiente para secagem. A seguir, 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 então foi realizada a quantificação em leitor de microplacas do tipo ELISA ajustado a um comprimento de onda de 595 nm (Biotrak II – Reader).

### **3.8 Análises estatísticas**

Trata-se de estudo quantitativo experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os resultados dos testes de inibição de crescimento bacteriano e da formação do biofilme bacteriano foram demonstrados através de gráficos. A diferença entre as médias das triplicatas foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com Bonferroni pós teste, 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  $p < 0,01$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade hemaglutinante

As lectinas isoladas de sementes de *Vatairea macrocarpa* e *Vatairea guianensis* mostraram atividade sobre a aglutinação de eritrócitos de coelho em todas as diluições testadas, demonstrando que o sítio de ligação a carboidratos mostra-se funcional, validando assim estas proteínas para os ensaios realizados (Figura 11).

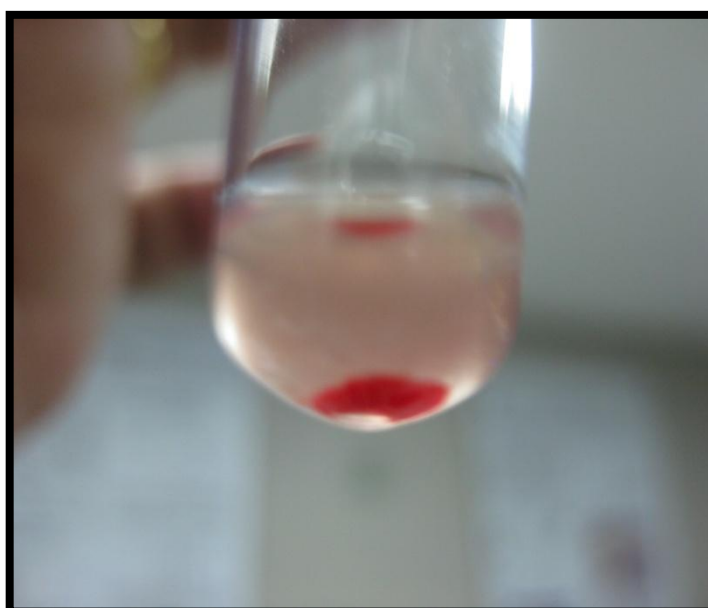


Figura 11 – **Atividade hemaglutinante das lectinas.** Fotografia de tubo de ensaio com suspensão de eritrócitos precipitada pela reação hemaglutinante da VML.

### 4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Em teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC), a *P. aeruginosa* não demonstrou suscetibilidade estatisticamente comprovada às lectinas isoladas de *Vatairea macrocarpa* e *Vatairea guianensis* em nenhuma das concentrações testadas como demonstrado nos gráficos a seguir (Gráficos 1 e 2, p.47).

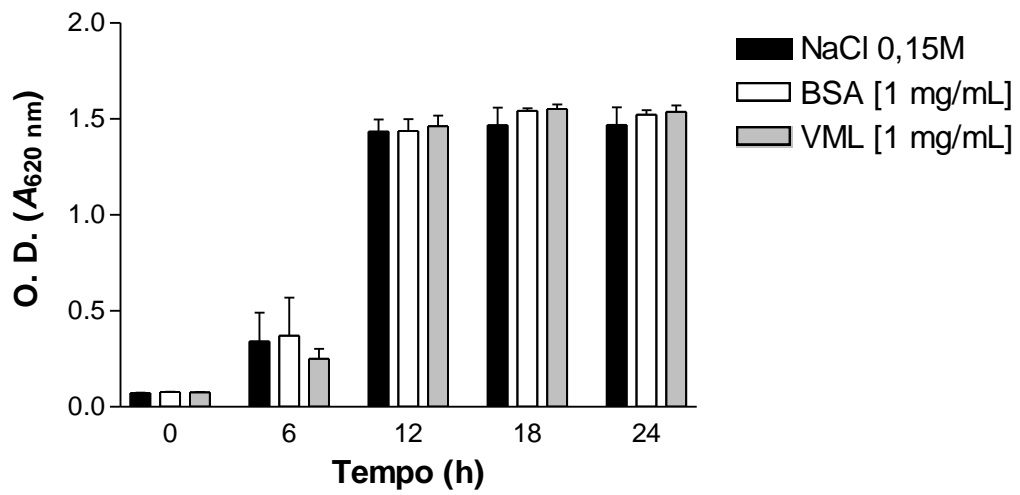


Gráfico 1 – Ensaio da Concentração Inibitória Mínima da lectina de *Vatairea macrocarpa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

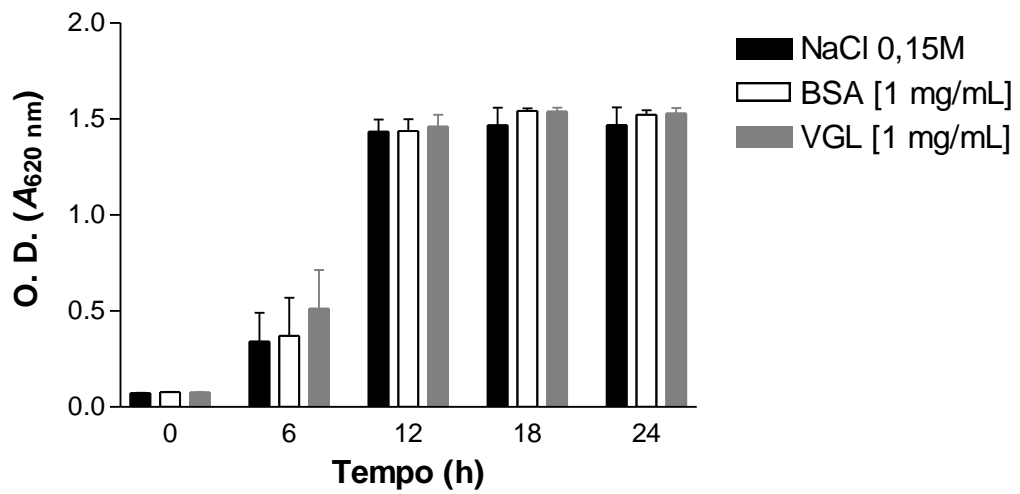


Gráfico 2 – Ensaio da Concentração Inibitória Mínima da lectina de *Vatairea guianensis* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Através da metodologia utilizada, nas concentrações de 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , o diterpeno casbano demonstrou ação antibacteriana para as formas planctônicas de *P. aeruginosa* conforme mostra o gráfico a seguir (Gráfico 3).

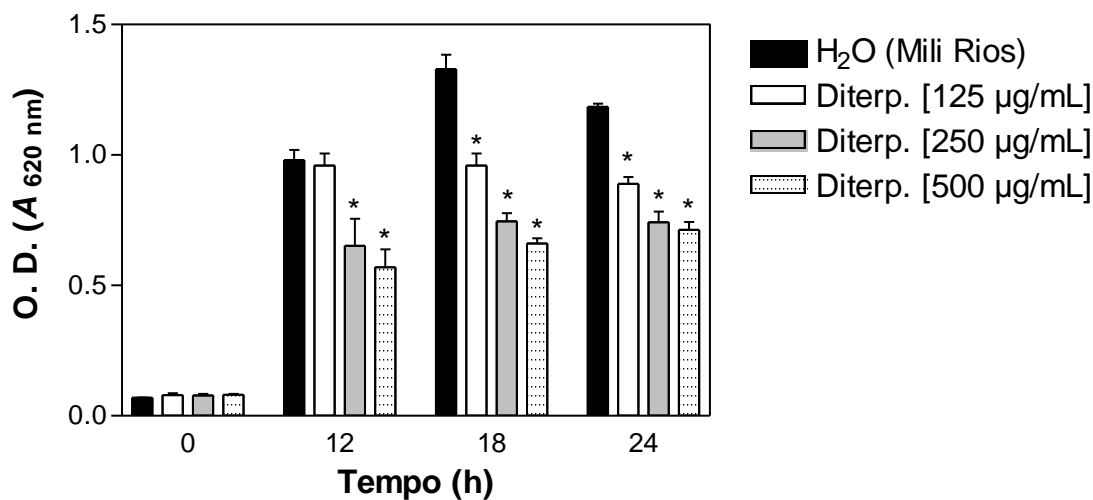


Gráfico 3 – Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do diterpeno casbano sobre *Pseudomonas aeruginosa*. (\*) Estatisticamente significante  $p < 0,01$  com relação ao controle (H<sub>2</sub>O Mili-Rios)

#### 4.3 Ensaio da formação do biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura

Em ensaio de formação de biofilme em placas de microtitulação, a cepa bacteriana *P. aeruginosa*, mostrou uma discreta formação de biofilme, não havendo diferença estatística significativa entre os meios de cultura utilizados no experimento (Gráficos 4 e 5, p. 48).



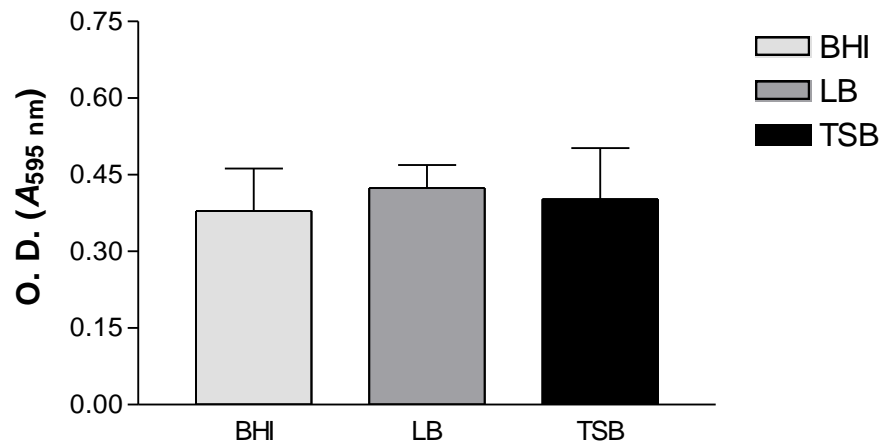


Gráfico 4 – Produção de biofilme de *P. aeruginosa* após 12 horas, com diferentes meios de cultivo.

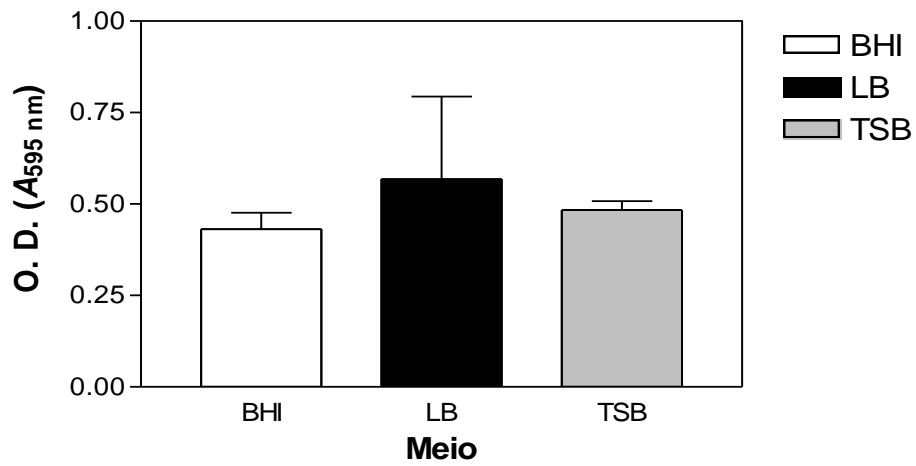


Gráfico 5 – Produção de biofilme de *P. aeruginosa* após 24 horas, com diferentes meios de cultivo.

#### 4.4 Atividade biológica das lectinas e do diterpeno casbano sobre biofilmes de *P. aeruginosa*

Nos ensaios de atividade biológica sobre a produção de biofilmes de *P. aeruginosa*, as substâncias testadas não demonstraram interferência sobre o crescimento do biofilme, conforme demonstram os próximos gráficos (Gráficos 6, 7 e 8).

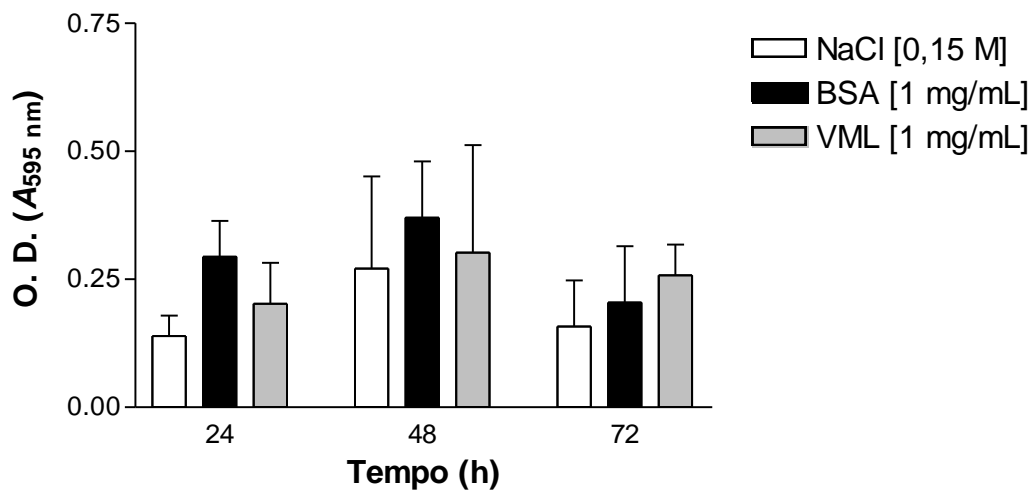


Gráfico 6 – Produção de biofilme de *P. aeruginosa* na presença da lectina de *Vatairea macrocarpa*.

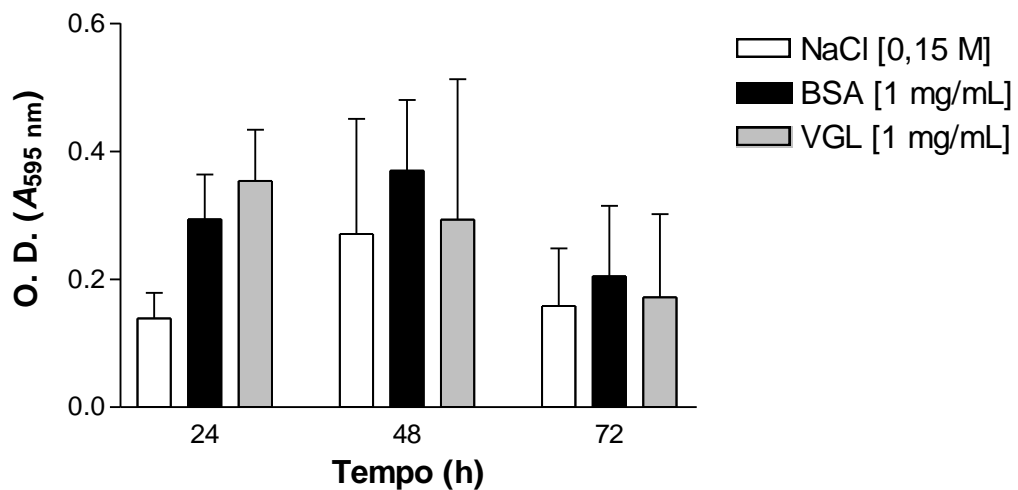


Gráfico 7 – Produção de biofilme de *P. aeruginosa* na presença da lectina de *Vatairea guianensis*.

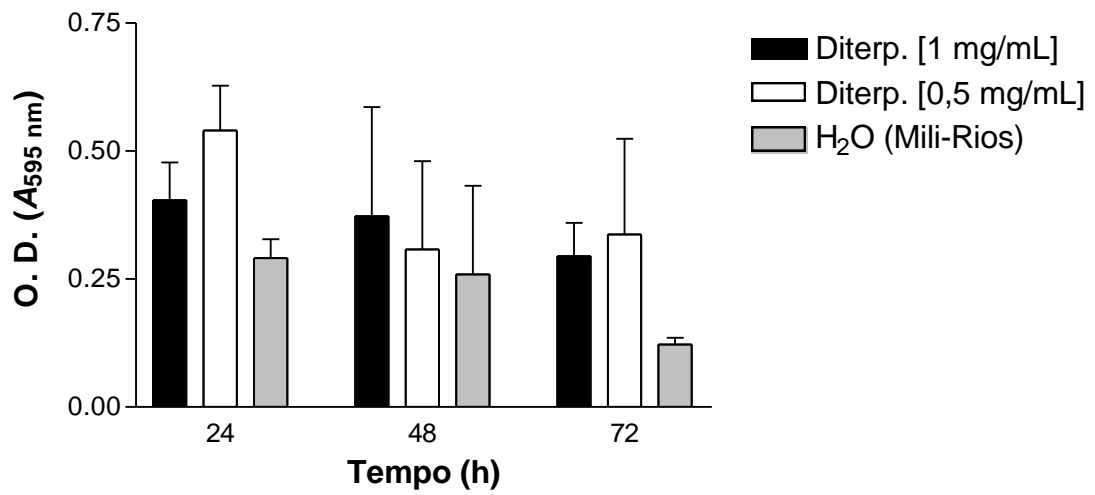


Gráfico 8 – Produção de biofilme de *P. aeruginosa* na presença do diterpeno casbano.

## 5 DISCUSSÃO

O uso de lectinas na terapia de várias patologias, como câncer e infecções bacterianas, já foi descrito (OFEK *et al.*, 1999). Já foi comprovado que lectinas bacterianas podem mediar a adesão da bactéria ao hospedeiro. 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). O uso de lectinas como terapia anti-adesão bacteriana também já foi estudado e comprovado, visto que lectinas de algas marinhas se mostraram efetivas na inibição da formação de biofilmes de estreptococos orais causadores de cárie. Estes efeitos podem ser explicados através da ligação entre a lectina e os carboidratos bacterianos, que levam ao dano celular bacteriano ou impedem a adesão bacteriana a superfície que servirá de base para a formação de biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

No sentido de verificar se as lectinas encontravam-se viáveis para os ensaios, optou-se pela realização dos testes de hemaglutinação. Tais testes demonstraram que o sítio de ligação a carboidrato encontrava-se preservado, visto que a hamaglutinação foi evidente.

Os resultados demonstram que as lectinas testadas não interferiram no desenvolvimento bacteriano da cepa testada, tanto na forma planctônica como no biofilme. A literatura reporta que polímeros de carboidratos foram identificados na matriz de *P. aeruginosa* e estão envolvidos no desenvolvimento do biofilme. Eles são polímeros ricos em glicose (FRIEDMAN; KOLTER, 2004) e manose (MATSUKAWA; GREENBERG, 2004). As lectinas avaliadas, através de ensaios prévios de inibição com monossacarídeo específico, foram seletivas para galactose, desta forma, pode-se acreditar que o fato das proteínas não exibirem atividade biológica esteja associado à condição da especificidade da ligação entre lectina e carboidrato.

Muito embora não tenha sido observado efeito significativo das lectinas utilizadas sobre a forma planctônica ou na inibição da formação de biofilme, trabalhos de Selvin *et al.* (2004) e Holanda *et al.* (2005), ambos utilizando lectinas de algas marinhas, demonstraram ação sobre crescimento das cepas de *P. aeruginosa*.

Na literatura encontramos o processo de formação de biofilmes de *P. aeruginosa* sendo realizado através de diferentes meios de cultura. Os meios BHI (OXLEY *et al.*, 2007), TSB (CERI *et al.*, 1999; BERRY *et al.*, 2000;) e LB (DRENKARD; AUSUBEL, 2002) são utilizados com bastante frequência. No intuito de otimizar o crescimento dos biofilmes, *P.*

*aeruginosa* foi cultivada nos três diferentes meios. Não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Assim sendo, optou-se pela utilização do meio BHI.

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes ao produto antimicrobiano, ou podem adquirir resistência pela mutação *de novo* ou pela aquisição de genes de resistência de outros microorganismos (FAJARDO *et al.*, 2008). A aquisição de materiais genéticos novos pela bactéria suscetível a antimicrobianos daquela não-suscetível pode ocorrer através da transferência gênica, pela conjugação (via plasmídeos e transposons conjugativos), pela transformação (através de bacteriófagos) ou transdução, pela incorporação no cromossomo bacteriano de DNA cromossômico ou por plasmídeos (HURDLE *et al.*, 2005; TENOVER, 2006; ALEKSHUN, 2007). É importante salientar que uma vez adquirido o gene da resistência, o mesmo não é perdido com muita facilidade.

Dentre as estratégias bacterianas para sobrepujar a atividade bactericida ou bacteriostática dos fármacos, estão à síntese de enzimas para inativação do antimicrobiano, modificação dos alvos de ação dos antimicrobianos, ou mesmo a produção de mecanismos de efluxo que previnem a entrada do fármaco, expulsando-o e assim evitando sua ação (SPRATT, 1994; WEBBER; PIDDOCK, 2003; WOODFORD; ELLINGTON, 2007).

As bombas de efluxo estão largamente envolvidas na resistência aos antibióticos. Diferentes bombas podem causar efluxo especificamente em um antibiótico ou até mesmo numa classe inteira. Um exemplo disso é o sistema NorA, que transporta quinolonas (POOLE, 2000). Em *P. aeruginosa* certas bombas conseguem transportar uma grande variedade de moléculas (NEYFAKH *et al.*, 1993).

O diterpeno fenólico totarol isolado de *Chamaecyparis nootkatensis* demonstrou potencial para inibir o sistema de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* (SMITH *et al.*, 2007). A inibição das bombas de efluxo (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN) diminuiu o nível de resistência intrínseca significativamente em cepas de *P. aeruginosa* altamente resistentes às fluoroquinolonas (LOMOVSKAYA *et al.*, 2001). Pode-se sugerir um provável mecanismo de ação para tal composto, uma vez que além das bombas de efluxo para antimicrobianos, outros sistemas de bombeamento que são necessários para as funções essenciais da célula microbiana poderiam estar sendo afetados pela presença do diterpeno casbano, justificando a morte das células. Outros compostos fitoquímicos apresentaram mecanismos de ação diferentes na inibição da *P. aeruginosa*. O carvacrol interage na permeabilidade da membrana celular. Peptídeos de *Moringa oleifera* atuaram na ruptura da membrana. Saponinas de *Acacia auriculiformis* interferiram em enzimas catabólicas e na

cadeia transportadora de elétrons. O composto 3,5-Diidroxi-4-etil-*trans*-estilbeno de *Xenorhabdus luminescens* atuou na inibição da síntese de RNA (SIMÕES *et al.*, 2008).

O diterpeno casbano foi capaz de inibir o crescimento da cepa *P. aeruginosa*, em sua forma planctônica, nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL nos tempos de 12, 18 e 24 horas de crescimento, porém não demonstrou inibição no processo de formação do biofilme de *P. aeruginosa* nas concentrações utilizadas neste estudo. Tal fato reforça a tese de que os biofilmes são 10 a 1000 vezes mais resistentes que a forma planctônica (MAH; O'TOOLE, 2001). Esta resistência sob a forma de biofilme poderia ser explicada pelo atraso na penetração do diterpeno casbano ocasionado pela matriz extracelular que representa uma barreira difusional para moléculas, influenciando na taxa de transporte da molécula para o interior do biofilme ou reação do material antimicrobiano com o material da matriz. Bem como foi demonstrado um atraso na penetração da ciprofloxacina no biofilme *P. aeruginosa* (SUCI *et al.*, 1994).

Outros estudos têm examinado a penetração de agentes antimicrobianos e a interação com substâncias poliméricas extracelulares dos biofilmes. Hatch e Schiller (1998) demonstraram que a suspensão de 2% alginato 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 examinaram a difusão de diversos agentes antimicrobianos (ceftazidima, piperacilina, gentamicina e tobramicina) através de gel alginato naturais ou sintéticos e encontrou que os antibióticos β-lactâmicos se difundem na matriz mais rapidamente que os aminoglicosídeos (GORDON *et al.*, 1988).

Além disso, células associadas ao biofilme crescem significativamente mais lentas do que células na forma planctônica, como resultado a captação agente antimicrobianos é mais lenta. Anwar e cols. (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).

A metodologia utilizada neste estudo não foi suficiente para elucidar o efeito inibidor do diterpeno casbano sobre as formas planctônicas de *P. aeruginosa*. Entretanto, parece lógico que a base para o mecanismo de ação reside na inibição de sistemas de efluxo, como observado anteriormente para o diterpeno fenólico. Neste sentido, novos estudos com aprofundamento da atividade biológica e mecanismos de ação do diterpeno casbano sobre a *P.*

*aeruginosa* e outros patógenos são necessários, seguindo com testes de citotoxicidade e naturalmente confluindo para protocolos em humanos.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se neste estudo que as lectinas isoladas de sementes de *Vatairea macrocarpa* e de *Vatairea guianensis* não são capazes de inibir o crescimento da *P. aeruginosa* tanto na forma planctônica como na forma de biofilme. A utilização de diferentes meios de cultura nos ensaios de formação dos biofilmes não está associada à produção do biofilme em si. O uso do diterpeno casbano inibe o crescimento da forma planctônica através do ensaio de MIC, não inibindo a formação do biofilme da *P. aeruginosa*.



## 7 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.

AH-TYE, C.; PARADISE, J. L.; COLBORN, D.K. Otorrhea in young children after tympanostomy-tube placement for persistent middle-ear effusion: prevalence, incidence, and duration. **Pediatrics**, v. 107, p. 1251-1258, 2001.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance, **Cell**, v. 23, p. 1037-1050, 2007.

ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediations of inflammation**, 8, 107-131, 1999.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M. B. Medical plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal Ethnobiol Etnomed**, v. 15, p. 1-7, 2006.

ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of aging biofilm: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

ARRUDA, T. T. P. Perfil de sensibilidade de cepas planctônicas e biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente a desafios antimicrobianos. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Ceará, p. 31-39, 41-43, 2007.

BAI, Y.; YANG, Y. P.; YE, Y. Hookerianolides A-C: three novel casbane-type diterpenoid lactones from *Mallotus hookerianus*. **Tetrahedron Lett.** v. 47, p. 6637-6640, 2006.

BAJPAI, V. K.; SHUKLA, S.; KANG, S. C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, j.biortech, 2008.

BARAKATE, M.; BECCKENHAM, E.; CUROTTA, J.; DA CRUZ, M. Bacterial biofilm adherence to middle-ear ventilation tubes: scanning electron micrograph images and literature review. **J Laryngol & Otol**, v. 121, p. 993-997, 2007.

BARONDES, S. H. Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem**, v. 13, p. 480 - 482, 1988.

BARROSO, G. M. **Sistemática Botânica de Angiospermas do Brasil** (1984). Viçosa: Imprensa Universitária (UFV). Volume 2.

BERNSTEIN, J. M.; HOLLAND, N. J.; PORTER, G. C.; MAW, A. R. Resistance of *Pseudomonas* to ciprofloxacin: implications for the treatment of malignant otitis externa. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 121, p. 118-123, 2007.

BERRY, J. A.; BIEDLINGMAIER, J. F.; WHELAN, P. J. In vitro resistance to bacterial biofilm formation on coated fluoroplastic tympanostomy tubes. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 123(3), p. 246-251, 2000.

BOUZA, E.; GARCIA – GARROTE, F.; CERCENADO, E.; MARIN, M. DIAZ, M. S. SANCHEZ, R. *Pseudomonas aeruginosa*: a multicenter study in 136 hospitals in Spain. **Rev Esp Quimioter**, v. 16(1), p. 41 - 52, 2003.

BURKE, B. A.; CHAN, W. R.; PASCOE, K. O.; BLOUNT, J. F.; MANCHAND, P. S. The structure of crotonitenone, a novel casbane diterpene from *Croton nitens* Sw. (Euphorbiaceae). **J. Chem. Soc. Perkin Trans I** v. 10, p. 2666-2669, 1981.

CAMACHO, R.A.R. **Atlas de cirurgia do ouvido**. Ed. Revinter, p. 99-103, 1999.

CERI, H. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1771-1776, 1999

CESPEDES, R.; CHACON, S.; MORA, A. L. Study of the content of tannin extracts of some plants in Costa Rica. **Ing. Cienc. Quim.** v. 14, p. 6-10, 1992.

CHOI, Y. H.; KIM, J.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Agrostistachin, a novel cytotoxic macrocyclic diterpene from *Agrostistachys hookeri*. **Tetrahedron Lett.** v. 27(48), p. 5795-5798, 1986.

CHOI, Y. H.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant anticancer agents, XLVI. Cytotoxiccasbane-type constituents of *Agrostistachys hookeri*. **J. Nat. Prod.** v. 51(1), p. 110-116, 1988.

CHOLE, R. A.; FADDIS, B. T. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. **Arch Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 128, p. 1129-1133, 2002.

CONSENSO BRASILEIRO DE OTITES MÉDIAS. Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia, 1998.

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

COTICCHIA, J.; ZULIANI, G.; COLEMAN, C.; CARRON, M.; GURROLA, J.; HAUPERT, M.; BERK, R. Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx: chronic rhinosinusitis vs obstructive sleep apnea. **Archives Otolaryngol head and Neck Surgery**, v. 133, p. 110-114, 2007.

DA COSTA, S. S.; CRUZ, O. L. M.; DE OLIVEIRA, J. A. A. **Otorrinolaringologia Princípios e Práticas**. ed. Artmed, 2006.

DEL SOL, R.; ARMSTRONG, I.; WRIGHT, C.; DYSON, P. Characterization of changes to the cell surface during the life-cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 2219 - 2225, 2007.

DRENKARD, E.; AUSUBEL, F. M. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. **Nature**, v. 416, p. 740 - 743, 2002.

EVANS, F. J.; TAYLOR, S. E. Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpenes of the plants families Euphorbiaceae and Thymelaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products** v, 44, p. 1-6, 1983.

FAJARDO, A.; MARTINEZ-MARTIN, N.; MERCADILLO, M.; GALAN, J. C.; GHYSELS, B.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P.; WIEHLMANN, L.; TUMMLER, B.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L. The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. **PlosOne**, v. 3, p. e1619, 2008.

FENNELL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGRAW, L.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FERREIRA, L.L. Estrutura clonal e resistência em *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de Mestrado, **Fundação Oswaldo Cruz**, p. 18, 2005.

FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P. Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clin Chest Med**, v. 20(2), p. 303 - 16, 1999.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 675 - 690, 2004.

GABIUS H. J.; GABIUS S. Glycoscience Status and Perspectives. Chapman & Hall, Weinheim, **Germany**, 1997.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de taxonomia vegetal. Plantas de interesse econômico, agrícola, ornamentais e medicinais** (1976). São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 186-187.

GORDON, C. A.; HODGES, N. A.; MARRIOTT, C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis derived *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v. 22, p. 667 - 674, 1988.

HALL-STOODLEY, L.; HU, F. Z.; GIESEKE, A.; NISTICO, L.; NGUYEN, D.; HAYES, J.; FORBES, M.; GREENBERG, D. P.; DICE, B.; BURROWS, A.; WACKYM, A.; STOODLEY, P.; POST, C.; EHRLICH, G. D.; KERSCHNER, J. E. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. **Jama**, v. 296, p. 202-211, 2006.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 1034-1043, 2009.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 23, p. 875-885, 2006.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 13, p.59-71, 1996.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 14, p. 245-258, 1997.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 15, p. 93-106, 1998.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 16, p. 209-219, 1999.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 17, p. 165-174, 2000.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 19, p. 125-132, 2002.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 20, p. 70-78, 2003.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 21, p. 312-320, 2000.

\_\_\_\_\_. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 22, p. 594-602, 2005.

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

HOLANDA, M. L.; MELO, V. M.; SILVA, L. M.; AMORIM, R. C.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Braz J Med Biol Res** v. 38 (12) p. 1769-73, 2005.

HUNGRIA, H. **Otorrinolaringologia**, Ed. Guanabara-Koogan, 8ed., p. 392-398, 2000.

HUNSAKER, D. H.; LEID J. G. The relationship of biofilms to chronic rhinosinusitis. **Cur Op Otol Head Neck Surg**, v. 16, p. 237-241, 2008.

HURDLE, J. G.; O'NEIL, A. J.; MODY, L.; CHOPRA, I.; BRADLEY, F. *In vivo* transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with failure of mupirocin prophylaxis. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 56, p. 1166-1168, 2005.

JANG, C. H.; PARK, H.; CHO, Y. B.; CHOI, C. H. Effect of vancomycin-coated tympanostomy tubes on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: in vitro study. **J. Laryngol Otol.**, p.1-5, 2010.

JARYSZAK, E. M.; SAMPSON, E. M.; ANTONELLI, P. J. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on ossicular reconstruction prostheses. **Am J. Otolaryngol**, v. 30, p. 367-370, 2009.

JOLY, A. B. Botânica. **Introdução à Taxonomia Vegetal** (1998). 12<sup>a</sup> edição. São Paulo: Companhia Editorial Nacional.

KANIA, R. E.; LAMERS, G. E.; VONK, M. J.; HUY, P. T.; HIEMSTRA, P. S.; BLOEMBERG, G. V.; GROTE, J. J. Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. **Arch Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 133, p. 115-121, 2007.

KASHMAN, Y.; BERNART, M. W.; TISCHLER, M.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. Koumbalones A and B, new casbane diterpenes from *Maprounea africana*. **J. Nat. Prod.** v. 57, p. 426-430, 1994.

KHIER, Y. M.; SALIH, A.M. Investigation of the nature of the molluscicidal factor of *Croton macrostachys*. **J. Afr. Med.** v. 2, p. 55, 1979.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p. 275-278, 2001.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and cymene. **Bioresource Technology**, p. 55 – 75, 2008.

LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. (1907). Beobachtungen über Hamolyse and Hemagglutination. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 45 660, *citado por* Gold & Balding, 1975.

LEE, M. R.; PAWLOWSKI, K. S.; LUONG, A.; FURZE, A. D.; ROLAND, P. S. Biofilm presence in humans with chronic suppurative otitis media. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 141, p. 567-71, 2009.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. **Academic Press**, 600, 1981.

LOMOVSKAYA, O.; WARREN, M. S.; LEE, A.; GALAZZO, J.; FRONKO, R.; LEE, M.; BLAIS, J.; CHO, D.; CHAMBERLAND, S.; RENAULT, T.; LEGER, R.; HECKER, S.; WATKINS, W.; HOSHINO, K.; ISHIDA, H.; LEE, J. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 45, p. 105 - 116, 2001.

MACASSEY, E.; DAWES, P. Biofilms and their role in otorhinolaryngological disease. **J. Laryngol Otol.**, v. 122, p. 1273-1278, 2008.

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão. **Clínica Veterinária**, v. 57, p. 74-82, 2005.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9 (1), p. 34-39, 2001.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. **Ann Med Exp Biol Fenn**, v. 35 (Suppl 11) p. 1 – 133, 1957.

MALATY, J.; ANTONELLI, P. J. Effect of blood and mucus on tympanostomy tube biofilm formation. **The Laryngoscope**, v. 118(5), p. 867-870, 2008.

MATSUKAWA, M.; GREENBERG, E. P. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4449 - 4456, 2004.

NEYFAKH, A. A.; BORSCHAND, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 37, p. 128-129, 1993

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: An initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462 – 466, 1960.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 process via multiple, convergent, signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 449-461, 1998.

OFEK, I.; KEISARI, Y. The biology and pathology of innate immunity mechanisms. **Adv Exp Med Biol**, v. 479, p. 27-36, 2000

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

OXLEY, K. S.; THOMAS, J. G.; RAMADAN, H. H. Effect of ototopical medications on tympanostomy tube biofilms. **The Laryngoscope**, v. 117, p. 1819-1824, 2007.

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

PERLOFF, J.R.; PALMER, J.N. Evidence of bacterial biofilm in a rabbit model of sinusitis. **American Journal of Rhinology**, v.19, p. 1-6, 2005

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins : versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 15, p. 199 – 227, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M. Proposal for a Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins. **Lectins**, v.10, p.105-117, 1995.

PINHEIRO, S. D.; RABELO, M.; ALENCAR, A **Otorrinolaringologia para a graduação**. Ed. UFC, 2ª. ed., p. 25-286, 2006.

POOLE, K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, p. 2233-2241, 2000.

POST, J. C.; HILLER, N. R.; NISTICO, L.; STOODLEY, P.; EHRLICH, G. D. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. **Cur Opin Otol Head Neck Surg**, v. 15, p. 347-351, 2007.

POTAPOV, I. M. Izv. Akad. Nank Kazah S.S.R. Ser., Soviet Union **Fiziol. Med.**, v.5, p. 712, 1968.

QUER, P. F. **Plantas Medicinales** (1980). Editora Labor S. A., pp. 180-181, Baecelona.

RADIS-BAPTISTA, G.; MORENO, F. B.; NOGUEIRA, L. L.; MARTINS, A. M.; OLIVEIRA, T. D.; TOYAMA, M. H.; CAVADA, B.S.; DE AZEVEDO, W. F. Jr, YAMANE, T. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochem Biophys**. v. 44(3), p. 412-23, 2006.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNÁNDEZ, I.; ALBÁN, J.; LOOCK, O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol**. v. 88, p. 199-204, 2003.



RUDIGER, H. **Plant** lectins more than just tools for glycoscientist: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat**, v. 161, p. 130 - 152, 1998.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**, v.8(1), p. 25 - 79, 2004.

SAIDI, I. S.; BIEDLINGMAIER, J. F.; WHELAN, P. In vivo resistance to bacterial biofilm formation on tympanostomy tubes as a function of tube material. **Otolaryngology Head Neck Surgery**, v. 120(5), p. 621-627, 1999.

SANCHEZ, V.; SANDOVAL, D.; HERRERA, P.; OQUEDO, M. Alkaloids in Cuban species of the genus *Croton* L. I. Preliminary chemical studies. **Rev. Cubana Farm.** v. 16, p. 39-44, 1982.

SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quim. Nova**, v. 31, p. 601-604, 2008.

SAUNDERS, J.; MURRAY, M.; ALLEMAN, A. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: scanning electron microscopy findings. **Am J. Otolaryngol.** v. 35 p. 232-237, 2009.

SELVIN, J.; LIPTON, A. P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **J. Mar. Sci. Technol.**, v. 12, p. 1-6, 2004

SHETTY, S. N.; ANIKA, S. M.; ASUZU, U.I. Investigations on *Croton pendullifolius* Hutch. Observations on pharmacognostic, physicochemical and pharmacological characteristics. **Int. J. Crude Drug Res.** v. 21, p. 49-58, 1983.

SIH, T; CHINSKI, A.; EAVEY, R.; GODINHO, R. **III manual de otorrinolaringologia pediátrica da iapo.** **IAPO**, p. 202-255, 2003.

SIMOES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Nat Prod Rep**, v. 26, p. 746-757.

SMITH, E. C.; WILLIAMSON, E. M.; WAREHAM, N.; KAATZAND, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 210 - 217, 2007

SPRATT, G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**, v. 264, p. 388-393, 1994

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

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.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**. v. 56, p. 187 – 209, 2002.

TATAR, E. C.; UNAL, F. O.; TATAR, I.; CELIK, H. H.; GURSEL, B. Investigation of surface changes in different types of ventilation tubes using scanning electron microscopy and correlation of findings with clinical follow-up. **Ped Otorhinol**, v. 70(3), p. 411-417, 2005.

TEIXEIRA, E.H. **Avaliação do potencial anticárie de lectinas vegetais**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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. **J App Microb**, v. 101 p. 111-116, 2007.

TENOVER, C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Infect. Control**, v. 34, p S3 – S10, 2006.

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.

VLASTARAKOS, P. V.; NIKOLOPOULOS, T. P.; MARAGOUDAKIS, P.; TZAGAROULAKIS, A.; FEREKIDIS, E. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they?. **The Laryngoscope**, v. 117, p. 668-673, 2007.

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/>.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 51, p. 9 - 11, 2003

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 13, p. 5 - 18, 2007.

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

YOUNG, D.; MORTON, R.; BARTLEY, J. Therapeutic ultrasound as treatment for chronic rhinosinusitis: preliminary observations. **J. Laryngol Otol.**, v. 28, p. 1-5, 2010