



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



GUSTAVO RAMOS SALLES FERREIRA

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LECTINAS CONTRA LINHAGEM
DE *Cryptococcus neoformans* E BIOFILME BACTERIANOS MULTIESPÉCIES

Recife

2022

GUSTAVO RAMOS SALLES FERREIRA

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LECTINAS CONTRA LINHAGEM
DE *Cryptococcus neoformans* E BIOFILME BACTERIANOS MULTIESPÉCIES

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito total
para obtenção do título de doutor em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Dra. Maiara Celine de Moura

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Ferreira, Gustavo Ramos Salles.

Estudo do potencial antimicrobiano de lectinas contra linhagem de *Cryptococcus neoformans* e biofilme bacterianos multiespécies. / Gustavo Ramos Salles Ferreira. – 2022.

84 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão.

Coorientadora: Maiara Celine de Moura.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, 2022.

Inclui referências.

1. Lectina. 2. Biofilme. 3. *Cryptococcus*. 4. *Staphylococcus*. I. Napoleão, Thiago Henrique. (orient.). II. Moura, Maiara Celine de. (coorient.). III. Título.

GUSTAVO RAMOS SALLES FERREIRA

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LECTINAS CONTRA LINHAGEM
DE *Cryptococcus neoformans* E BIOFILME BACTERIANOS MULTIESPÉCIES

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito total
para obtenção do título de doutor em
Ciências Biológicas.

Data: 23 / 02 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque
Universidade Federal do Piauí

Dr. Marília Cavalcanti Coriolano
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Pollyanna Michelle da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Infecções associadas ao desenvolvimento de biofilmes microbianos representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública. As bactérias e fungos em biofilmes apresentam elevada resistência ao sistema imune do hospedeiro e à antibioticoterapia convencional. Nesse contexto, compostos bioativos isolados de plantas têm sido estudados para suprir a necessidade de novos agentes com ação antibiofilme. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são leveduras encapsuladas que possuem como determinantes de virulência uma cápsula polissacarídica e a formação de biofilme, entre outros. Ambas as espécies causam a criptococose, doença distribuída mundialmente. Atualmente a principal abordagem terapêutica para o tratamento da criptococose é feita através da combinação de fármacos antifúngicos, porém os crescentes níveis de resistência à tratamentos antimicrobianos, bem como seus altos custos, toxicidade instigam a necessidade de novas alternativas. Atividades antimicrobiana e antibiofilme já foram relatadas para as lectinas CasuL e PgTeL, isoladas de *Calliandra surinamensis* e *Punica granatum*. Na presente tese, foram investigadas: a capacidade de CasuL em inibir a formação de biofilme multicepas e multiespécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*, tanto isoladamente quanto em combinação com antibióticos comerciais (ceftazidima, cefotixina e oxacilina); e possíveis atividades fungistática e fungicida de CasuL e PgTeL frente a *C. neoformans* e *C. gatii*, bem como a capacidade de CasuL e PgTeL em inibir a formação da cápsula polissacarídica e afetar biofilmes formados pela linhagem B3501 de *C. neoformans*. Os resultados mostraram que quando testados isoladamente, CasuL e antibióticos comerciais não apresentaram capacidade inibitória na formação dos biofilmes bacterianos multicepas ou multiespécies. Porém, quando em conjunto com o antibiótico ceftazidima, CasuL inibiu significativamente a formação de biofilme multicepa por *S. aureus* UFPEDA-670 + MRSA e por *S. aureus* UFPEDA-670 + 8325-4. Nos ensaios de atividade anticriptocócica, CasuL não apresentou atividade fungistática nem fungicida, nem foi capaz de inibir a formação ou erradicar biofilmes. Já PgTeL apresentou atividade fungistática contra a cepa B3501 de *C. neoformans* (sorotipo D), com uma concentração mínima inibitória de 172 µg/mL. PgTeL também foi capaz de inibir a formação de biofilme por B3501, reduzindo significativamente a biomassa e a atividade metabólica, além de erradicar biofilmes pré-formados. PgTeL, contudo,

não foi capaz de alterar o tamanho de cápsulas formadas por B3501. A ação fungistática e antibiofilme de PgTeL sobre B3501 também foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Em conclusão, o estudo demonstrou que: combinação de CasuL e ceftazidima pode ter aplicabilidade na inibição da formação de biofilmes multicepas por *S. aureus*; e que a lectina de *P. granatum* é uma potencial candidata a novo agente anticriptocócico, abrindo portas para estudos mais aprofundados em seu mecanismo de ação e possíveis estratégias de aplicação.

Palavras-chave: Lectina. Biofilme. *Cryptococcus*. *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Infections associated with the development of bacterial biofilms represent one of the great current public health challenges. Bacteria in biofilms are highly resistant to the host's immune system and to conventional antibiotic therapy. In this context, bioactive compounds isolated from plants have been studied to meet the need for new agents with antibiofilm action. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are encapsulated yeasts that have a polysaccharide capsule and biofilm formation as virulence determinants, among others. Both species cause cryptococcosis, a disease distributed worldwide. Currently, the main therapeutic approach for the treatment of cryptococcosis is done through the combination of antifungal drugs, but the increasing levels of resistance to antimicrobial treatments, as well as their costs, instigate the need for new alternatives. Antimicrobial and antibiofilm activities have already been reported for the lectins CasuL and PgTeL, isolated from *Calliandra surinamensis* and *Punica granatum*. In the present thesis, it was investigated: the ability of CasuL to inhibit the formation of multistrain and multispecies biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus*, either alone or in combination with commercial antibiotics (ceftazidime, cefotixin and oxacillin); and possible fungistatic and fungicidal activities of CasuL and PgTeL against *C. neoformans* and *C. gattii*, as well as the ability of PgTeL to inhibit the formation of the polysaccharide capsule and affect biofilms formed by the B3501 strain of *C. neoformans*. The results showed that when tested alone, CasuL and commercial antibiotics did not show an inhibitory capacity on the formation of multistrain or multispecies bacterial biofilms. However, when combined with the antibiotic ceftazidime, CasuL significantly inhibited multistrain biofilm formation by *S. aureus* UFPEDA-670 + MRSA and by *S. aureus* UFPEDA-670 + 8325-4. In the anticryptococcal activity assays, CasuL did not show fungistatic or fungicidal activity, nor was it able to inhibit the formation or eradicate biofilms. PgTeL, on the other hand, showed fungistatic activity against the B3501 strain of *C. neoformans* (serotype D), with a minimum inhibitory concentration of 172 µg/mL. PgTeL was also able to inhibit biofilm formation by B3501, significantly reducing biomass and metabolic activity, in addition to eradicating preformed biofilms. PgTeL, however, was not able to change the size of capsules formed by B3501. The fungistatic and antibiofilm action of PgTeL on B3501 was also observed by scanning electron microscopy. In

conclusion, the study demonstrated that: the combination of CasuL and ceftazidime may have applicability in inhibiting the formation of multistrain biofilms by *S. aureus*; and that the *P. granatum* lectin is a potential candidate for a new anticryptococcal agent, opening doors for further studies on its mechanism of action and possible application strategies.

Keywords: Lectins. Biofilm. *Cryptococcus*. *Staphylococcus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1	LECTINAS ANTIMICROBIANAS	12
3.2	BIOFILME	13
3.3	PRODUTOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME	16
3.4	<i>Cryptococcus spp.</i>	17
3.5	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19
3.6	Lectina da sarcotesta de <i>Punica granatum</i> (PgTeL)	22
3.7	Lectina de <i>Calliandra surinamensis</i> (CasuL)	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	ARTIGO 1	25
4.2	ARTIGO 2	43
4.3	ARTIGO 3	54
5	CONCLUSÕES	70
6	SUMULA CURRICULAR	71
7	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes representam comunidades microbianas capazes de aderir a superfícies bióticas (tecidos ou órgãos) ou abióticas (inertes), sendo formados por células e uma matriz polimérica extracelular (RENDUELES et al., 2013). A adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme em equipamentos e implantes médicos representam um grande obstáculo para a erradicação de infecções persistentes. Isso se deve ao fato de que uma das mais importantes características dos biofilmes é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e a agentes antimicrobianos (BUSSCHER et al., 2012). Sabe-se que as células bacterianas em biofilmes podem tolerar concentrações até 1.000 vezes maiores dos antibióticos do que quando estão na forma planctônica (BUHMANN et al., 2016). Esse fato limita as opções terapêuticas de infecções associadas a dispositivos médicos (DI MARTINO et al., 2002; BUHMANN et al., 2016). Nesse contexto, pesquisas têm sido realizadas buscando compostos bioativos para prevenir a formação de biofilmes (BUSSCHER et al., 2012; TRENTIN et al., 2015).

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras encapsuladas amplamente encontradas no meio ambiente que têm sido associadas a doenças em humanos desde o século XIX. Porém, com o surgimento da infecção pelo HIV, a incidência de infecções por essas duas espécies aumentou significativamente em meados do final do século XX, e foi estimado que poderia afetar cerca de 10% dos pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) (HEITMAN et al., 2011; ZARAGOZA, 2019). Essas duas espécies de *Cryptococcus* são as principais responsáveis pela meningite criptocócica tanto em indivíduos vulneráveis como em indivíduos imunocompetentes, estimando-se que cerca de 223.100 casos dessa doença ocorram globalmente anualmente, com uma taxa de óbitos de cerca de 181.100 pessoas (KWON-CHUNG et al. 2014; RAJASINGHAM et al., 2017). A maioria dessas mortes ocorrem principalmente em países com recursos limitados devido à falta de acesso a medicamentos adequados e ao alto custo dos tratamentos mais eficazes, o que significa uma urgência na busca por tratamentos mais acessíveis e eficientes contra esses patógenos (LOYSER et al., 2019; IYER et al., 2021).

Lectinas, proteínas que ligam carboidratos, são amplamente distribuídas em plantas e apresentam diversas atividades biológicas, incluindo antibacteriana,

antifúngica e antibiofilme (KLAFKE et al. 2013; DIAS et al. 2015). A atividade antibiofilme de lectinas pode envolver a capacidade dessas moléculas em alterar a viabilidade das células, interagir com constituintes presentes na matriz exopolimérica do biofilme, interrompendo sua polimerização, e inibir sinais *quorum sensing*, que são essenciais no processo de comunicação intercelular necessário para a formação de biofilmes e expressão da virulência (ISLAM et al., 2009; KLAFKE et al., 2013).

PgTeL, lectina ligadora de quitina isolada da sarcotesta do fruto da romãzeira (*Punica granatum*), é uma proteína de 26 kDa que apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida krusei*, e também inibiu a formação de biofilme por *C. albicans*. Ainda, PgTeL possui atividades bacteriostática e bactericida contra linhagens resistentes e não resistentes a antibióticos e é capaz de impedir a adesão e invasão de células por isolados bacterianos de diferentes espécies. PgTeL promoveu inibição de formação de biofilme por isolados de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamase (SILVA et al., 2016, 2018, 2019a, 2019b, 2020).

Calliandra surinamensis é uma planta da família Fabaceae conhecida popularmente como “espanador-de-índio” ou “esponjinha rosa”, cujos folíolos contêm uma lectina denominada CasuL (*C. surinamensis* lectin). CasuL é uma proteína acídica de 48 kDa, resistente ao aquecimento e que apresentou atividade citotóxica para células humanas de leucemia (K562) e câncer de mama (T47D), atividade antifúngica contra *Candida krusei*, ação bacteriostática e antibiofilme contra *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* e ação antibacteriana e antibiofilme – isoladamente e em combinação com tetraciclina e ampicilina – contra isolados de *Staphylococcus* causadores de mastite bovina e caprina (PROCÓPIO et al., 2017, 2019).

Diante dos potenciais antimicrobiano e antibiofilme relatado para lectinas vegetais e dos resultados previamente descritos com as lectinas PgTeL e CasuL, esse trabalho investigou as hipóteses de que CasuL poderia ser uma ferramenta útil no controle de biofilme bacterianos multicepas e multiespécies e de que PgTeL e CasuL poderiam ser ativas contra fungos do gênero *Cryptococcus*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar lectinas vegetais quanto a atividade antibiofilme contra comunidades bacterianas multicepas e multiespécies e quanto à atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*.

2.2.ESPECÍFICOS

- Isolar CasuL e PgTeL seguindo procedimentos previamente estabelecidos;
- Estabelecer protocolo de formação de biofilme multicepas e multiespécies *in vitro* por *S. saprophyticus* e *S. aureus*;
- Avaliar o potencial *in vitro* de CasuL e PgTeL em inibir e/ou erradicar a formação de biofilmes bacterianos multicepas e multiespécies;
- Avaliar o potencial antibiofilme de CasuL e PgTeL em combinação com antibióticos comerciais.
- Avaliar o potencial antifúngico das lectinas frente a isolado de *Cryptococcus neoformans*
- Avaliar o potencial das lectinas em inibir a formação e erradicar biofilme de *C. neoformans*
- Investigar alterações ultraestruturais nas células fúngicas tratadas com PgTeL.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LECTINAS ANTIMICROBIANAS

Lectinas são proteínas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em micro-organismos, plantas e animais. Elas possuem ao menos um sítio não-catalítico de ligação reversível a mono, oligo ou polissacarídeos (SANTOS et al., 2013; COELHO et al., 2018). As propriedades de ligação a carboidratos das lectinas estão envolvidas nas interações com células, desempenhando papéis importantes na defesa imunológica contra patógenos, bloqueio de infecções virais e inibição de adesão e migração de células microbianas, por exemplo (IORDACHE et al., 2015). Devido a essa capacidade, as lectinas têm apresentado as mais diversas atividades biológicas, tais como: imunomoduladora (WANG et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2020); antiviral (DE CAMARGO et al., 2019; EL-MARADNY et al., 2021); inseticida (ALVES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020), anticâncer (BUTHIA et al., 2019; MAZALOVSKA et al., 2020), anti-inflamatória (FONTENELLE et al., 2018; MESQUITA et al., 2021), antimicrobiana entre outras.

A ação antimicrobiana de lectinas pode se dar por meio de interações com peptídeos glicanos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos, ácidos teicoicos e teicurônicos, glucanas, mananas, quitina, entre outras moléculas presentes nas paredes celulares bacterianas e fúngicas, o que pode levar à alteração da permeabilidade celular, formação de poros nas superfícies, aglutinação e imobilização das células microbianas, inibição do crescimento e consequente morte celular (MOURA et al., 2015; IORDACHE et al., 2015). A lectina da inflorescência de *Alpinia purpurata* (ApuL) foi capaz de inibir o crescimento de cepas bacterianas resistentes e não-resistentes à metilicina de *Staphylococcus aureus* e cepas fúngicas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, através de mecanismos distintos como aglutinação das células microbianas, extravasamento do conteúdo protéico celular e malformações nas estruturas da parede celular (FERREIRA et al., 2018). A lectina do tipo C extraída do soro da ostra *Etroplus suratensis* (Es-Lec) foi capaz de causar aglutinação das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, além de possuir atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-negativas *Vibrio parahaemolyticus* e *Aeromonas hydrophila* (RUBEENA et al., 2019). Silva et

al.(2019) demonstraram que a lectina das raízes de *Portulaca elatior* (PeRoL) possui efeito bacteriostático contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, bem como efeito fungicida contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. As lectinas também têm demonstrado potencial na inibição da formação de comunidades bacterianas chamadas de biofilmes (MOURA et al., 2017; AGUILAR et al., 2019).

3.2 BIOFILMES

Biofilmes microbianos podem ser definidos como comunidades microbianas sésseis estabelecidas em uma estrutura tridimensional composta por células procarióticas e/ou eucarióticas envoltas em uma matriz extracelular formada por substâncias poliméricas produzidas por esses micro-organismos, que os fornece força para interação e posterior fixação em superfícies vivas ou inanimadas (AZEREDO et al. 2017; JAMAL et al. 2018). A formação do biofilme (Figura 1) apresenta como suas principais etapas: (I) adesão e fixação da comunidade microbiana na superfície através de estruturas como flagelos ou através de interações moleculares como forças de Van der Waals e interações eletrostáticas; (II) a formação de micro-colônias por um processo de multiplicação das células microbianas por meio de sinalizações químicas; (III) a formação e maturação do biofilme por meio da expressão de genes para formação da substância polimérica extracelular (EPS) através de comunicações entre as células microbianas por sinais autoindutores denominados de *quorum sensing*; e (IV) a dispersão do biofilme, etapa onde as células microbianas realizam uma rápida multiplicação e consequente dispersão, retornando para a forma móvel (VASUDEVAN, 2014; JAMAL et al. 2018).

Figura 1: Etapas da formação do biofilme



Fonte: Adaptado de Toyofuku et al. (2016).

Biofilmes têm sido implicados em diversas doenças humanas, tais como prostatite, cárie, rinosinusite, otite média, fibrose cística, endocardite, osteomielite, infecções pulmonares, infecções urinárias, entre diversas outras (PERCIVAL, 2017, GEBREYOHANNES et al., 2019). Por exemplo, biofilmes formados por bactérias do gênero *Enterococcus* são frequentemente observados em feridas, infecções dos tratos urinário e gastrointestinal e endocardites (CH'NG et al., 2019). Além disso, tem sido relatada uma alta incidência na formação de biofilmes em dispositivos médicos como cateteres, implantes ortopédicos, lentes de contato e dispositivos eletrônicos implantáveis, o que tem levado a uma alta taxa de infecções envolvendo esses dispositivos (ROMLING et al. 2012, PERCIVAL, 2017). A composição e o perfil dos micro-organismos que vão formar o biofilme variam com o tipo de dispositivo e da duração da ação. Por exemplo, o perfil de bactérias na formação de biofilmes em cateteres venosos centrais vai ser afetado pela natureza do fluido presente no cateter, onde bactérias gram-positivas como *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* não crescem bem em fluidos intravenosos, enquanto gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* conseguem sustentar seu crescimento nesses fluidos (JAMAL et al. 2018). O *National Institutes of Health* (NIH) estima que cerca de 80% das infecções humanas conhecidas estão associadas a biofilmes, e o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos relata que mais de 65% de todas as infecções adquiridas em hospitais são atribuíveis a biofilmes (PERCIVAL, 2017, BJARNSHOLT et al., 2018).

Diagnosticar infecções por biofilme constitui tarefa extremamente difícil, pois raramente são infecções resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, mesmo em indivíduos saudáveis e com excelente reações do sistema imune celular

e humoral (SATPATHY et al., 2016). Le et al. (2018) demonstraram que, devido a sua capacidade de modular vários aspectos da resposta imune inata do hospedeiro, o biofilme formado por *S. epidermidis* foi capaz de evadir da ação do sistema imune inato e persistir em superfícies de dispositivos implantados, sendo assim difícil diagnosticá-lo antes de um estágio mais avançado da infecção e consequentemente mais difícil de se tratar.

Biofilmes são frequentemente compostos por duas ou mais espécies microbianas, com cada uma dessas espécies trazendo e transmitindo suas próprias características únicas e que não estão presentes em suas contrapartes de biofilmes monoespécies (FLEMMING et al., 2016). Os biofilmes multiespécies são amplamente encontrados em dispositivos médicos e estão associados a uma quantidade significativa de infecções relacionadas a esses dispositivos, sendo assim um grave problema para a saúde humana e para os sistemas de saúde (KVICH et al., 2020, JOSHI et al., 2021). Por exemplo, biofilmes multiespécies de bactérias uropatogênicas como *Proteus*, *Staphylococcus*, *Providencia* e *Ureaplasma* são quase sempre responsáveis por infecções do trato urinário associadas a cateteres e a consequente produção de cálculos infecciosos (NORSWORTHY e PEARSON, 2017).

Devido a sua estrutura, natureza adaptativa e atributos fisiológicos dos micro-organismos que os compõem, os biofilmes são altamente tolerantes a agentes antimicrobianos e à defesa do hospedeiro (GEBREYOHANNES et al., 2019). Alguns aspectos que contribuem para a resistência são: expressão gênica alterada de fatores de resistência específicos dos biofilmes (bombas de efluxo) em comparação com células planctônicas; menor sensibilidade aos antibióticos devido à baixa taxa de crescimento e atividade metabólica das células; modificação dos alvos dos antibióticos; degradação dos antibióticos por enzimas produzidas pela matriz extracelular; microambiente alterado do biofilme e a dificuldade de penetração dos antimicrobianos na matriz do biofilme (ABDEL-AZIZ et al., 2014, JOLIVET-GOUGEON et al., 2014). Devido a esse comportamento de maior resistência, patógenos formadores de biofilmes são muito mais desafiadores para o tratamento com antibióticos convencionais (GEBREYOHANNES et al., 2019). Portanto, torna-se necessário investigar novas estratégias para lidar com infecções crônicas associadas a biofilmes (JAMAL et al., 2018).

3.3 PRODUTOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Vários produtos naturais demonstraram interferir na formação de biofilmes, inclusive descobriu-se que diversos metabólitos de origem vegetal têm efeitos moduladores e de antiformação de biofilmes (SONG et al., 2018). Os efeitos antibiofilme de produtos naturais baseiam-se principalmente nos seguintes aspectos: supressão da adesão e fixação celular; inibição da formação da matriz polimérica extracelular e diminuição da produção dos fatores de virulência, o que leva ao bloqueio do sistema *quorum sensing* e, conseqüentemente, do desenvolvimento do biofilme (Lu et al., 2019).

Bazargani et al. (2016) demonstraram que o extrato metanólico das sementes das plantas *Coriandrum sativum* L., *Pimpinella anisum* L. e das folhas de *Mentha x piperita* L. foram capazes de inibir a formação de biofilme de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* tanto pela redução da biomassa do biofilme, como também pela diminuição da atividade metabólica das células. Os óleos essenciais também têm demonstrado atividade antibiofilme, como o óleo essencial das folhas secas de *Eucalyptus staigeriana*, que inibiu a formação do biofilme de diversas cepas resistentes de origem clínica ou alimentícia da bactéria *Enterococcus faecalis* (CORREA et al., 2019); e o óleo essencial da *Mentha x piperita* L., que demonstrou capacidade de inibição de formação e inativação de biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus* em ambientes de processamento de alimentos (KANG et al., 2019).

Metabólitos secundários isolados de plantas tais como alcaloides, polifenóis e terpenos, têm demonstrado um interessante potencial antibiofilme. Lee et al. (2017) demonstraram que a harmalina e o norharmano, alcaloides derivados das sementes de *Peganum harmala* L., causaram inibição de formação de biofilme de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*. Sobre a atividade antibiofilme de polifenóis, diversas pesquisas revelaram que, além da atividade destrutiva das células microbianas, esses compostos também podem afetar os mecanismos de regulação do biofilme tais como o *quorum sensing* e outros sistemas reguladores (SILVA et al., 2016; SLOBODNIKOVA et al., 2016). Foi demonstrado que o ácido tânico do chá de *Camellia sinensis* foi capaz de inibir a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* e conseqüentemente sua colonização faríngea em modelos *in vivo* de roedores (PAYNE et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos são peptideos curtos, carregados positivamente, encontrados em vertebrados, bactérias e plantas. Eles possuem uma ampla atividade antimicrobiana e antibiofilme, agindo através da formação de poros na superfície das células microbianas; em alguns casos possuem alvos específicos em determinadas espécies, o que contribui para uma atividade antimicrobiana seletiva (BAHAR et al., 2013; DELATTIN et al., 2017). Os peptídeos da classe das defensinas RsAFP2 e HsAFP1, isolados das sementes de *Raphanus sativus* e *Heuchera sanguinea*, respectivamente, demonstraram capacidade de inibir o biofilme de *Candida albicans* (VRIENS et al., 2015; VRIENS et al., 2016).

Lectinas também são potentes agentes naturais com ação antibiofilme. Estudos sugerem que a capacidade das lectinas de se ligarem a carboidratos, bem como a outras moléculas, como proteínas, pode interromper a polimerização desses componentes e a formação de biofilme (SAHA et al., 2014). As lectinas também podem interferir no desenvolvimento do biofilme afetando a viabilidade das células microbianas, reduzindo a expressão de genes relacionados aos mecanismos de *quorum sensing* e formação de biofilme, e interagindo com surfactantes, enzimas e polissacarídeos envolvidos na produção de biofilme (PROCÓPIO et al., 2017; COELHO et al., 2018). Como exemplo dessa ação antibiofilme, Carneiro et al. (2017) demonstraram que a lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* (ALL) foi capaz de inibir a formação de biofilme de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus*. A lectina extraída da hemolinfa do camarão *Penaeus semisulcatus* foi capaz de inibir significativamente a formação de biofilme por duas bactérias Gram-negativas (*Vibrio parahaemolyticus* e *Aeromonas hydrophila*) e duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Enterococcus faecalis*) (PREETHAM et al., 2020).

A presente tese traz, na seção 4, o capítulo de livro “Natural products for biofilm control: Action mechanisms and innovative proposals”, que aborda em maiores detalhes produtos naturais de origem vegetal e animal que apresentam a capacidade de prevenir e modular a formação de biofilmes por bactérias e fungos. Informações sobre os mecanismos de ação e estratégias inovadoras para aplicação e melhoramento desses agentes antibiofilmes também são abordadas.

3.4 *Cryptococcus*

Cryptococcus é um gênero de fungos basidiomicetos que possuem forma

leveduriforme, de metabolismo predominantemente aeróbico, que podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e possuem como principal característica fenotípica a presença de uma cápsula polissacarídica que envolve sua estrutura celular (MOURAD et al., 2018; ZARAGOZA, 2019). Dentre as espécies desse gênero, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as únicas de interesse para a saúde humana, pois são patógenos oportunistas capazes de causar a criptococose, doença infecciosa invasiva que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, atingindo sobretudo o sistema nervoso central, causando uma meningoencefalite fúngica com alta mortalidade tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento; em 2014 esse índice foi de cerca de 20% de mortalidade nos Estados Unidos, 20% a 30% na Europa e chegando até 70% em países de baixa renda (RAJASINGHAM et al., 2017; MOURAD et al., 2018).

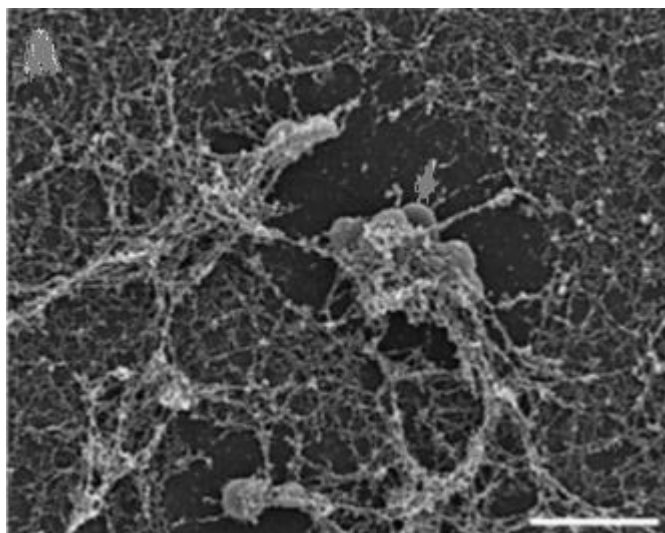
A infecção ocorre através da inalação dos esporos, com o alojamento deles nos alvéolos pulmonares, a partir de onde se disseminam por todo o organismo do hospedeiro, conseguindo ultrapassar a barreira hematoencefálica e invadir o sistema nervoso central (SANTIAGO-TIRADO et al., 2017). Através de sua imensa capacidade adaptativa às mais diversas condições do ambiente do hospedeiro, tais como pH, estresse oxidativo e disponibilidade de nutrientes, e de seus fatores de virulência, as espécies de *Cryptococcus* conseguem evadir da resposta imune do hospedeiro (ZARAGOZA, 2019). Os principais fatores de virulência de *Cryptococcus* são: a cápsula polissacarídica, que além de auxiliar na defesa da célula fúngica contra o sistema imune do hospedeiro contribui com cerca de 25% dos seus compostos de virulência; a capacidade de produzir melanina, um pigmento de cor escura que fornece resistência a múltiplos fatores de estresse como altas temperaturas, radicais livres e radiação ionizante; e a formação de biofilmes. (CASADEVALL et al., 2019; ZARAGOZA, 2019).

O tratamento para a criptococose varia de acordo com a severidade da infecção e a condição do sistema imune do hospedeiro, onde *Cryptococcus* spp. são suscetíveis a três classes de antifúngicos: os azóis, a fluocitosina e os polienos (MOURAD et al., 2018; BERMAS et al., 2020). Para indivíduos infectados com HIV e meningite criptocócica, geralmente se recomenda para tratamento inicial o uso da combinação de fluocitosina com o polieno anfotericina B, e posteriormente o azol fluconazol para consolidação e manutenção do tratamento, que pode durar até 12 meses ou mais (SRICHATRAPIMUK et al., 2016; PERFECT et al., 2018). Contudo,

pesquisas relatam o aparecimento de cepas de *Cryptococcus* spp. resistentes a fluocitosina (RHODES et al., 2017), fluconazol (SMITH et al., 2015) e anfotericina B (BERMAS et al., 2018).

A capacidade de *Cryptococcus neoformans* de formar biofilme (Figura 2) confere proteção dessas células fúngicas contra a fagocitose de macrófagos nos tecidos além de aumentar a resistência a antibióticos como a anfotericina B e fluconazol. Ainda, a presença desses biofilmes em dispositivos médicos como válvulas cardíacas e *shunts* ventriculoperitoneais traz a necessidade da busca por novos fármacos e terapias alternativas com potencial ação tanto na sua forma planctônica como também na forma de biofilme (DELATTIN et al., 2014; MARTINEZ et al., 2015; KUMARI et al., 2017).

Figura 2: Biofilme de *Cryptococcus neoformans* (microscopia eletrônica de varredura)



Fonte: Adaptado de Martinez & Casadevall (2005).

3.5 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*

Staphylococcus saprophyticus é um coco Gram-positivo, coagulase negativo e não-hemolítico, encontrado tanto no ambiente como em diversas regiões da microbiota humana, tais como períneo, reto, uretra, cérvix e trato gastrointestinal; ele pode causar comumente diversos tipos de infecções nosocomiais em seres humanos, principalmente infecções não complicadas do trato urinário, mas também pode causar pielonefrites agudas, uretrites, epididimite e prostatites (ARGEMI et al., 2019; PINAULT et al., 2019). *S. saprophyticus* corresponde ao segundo maior

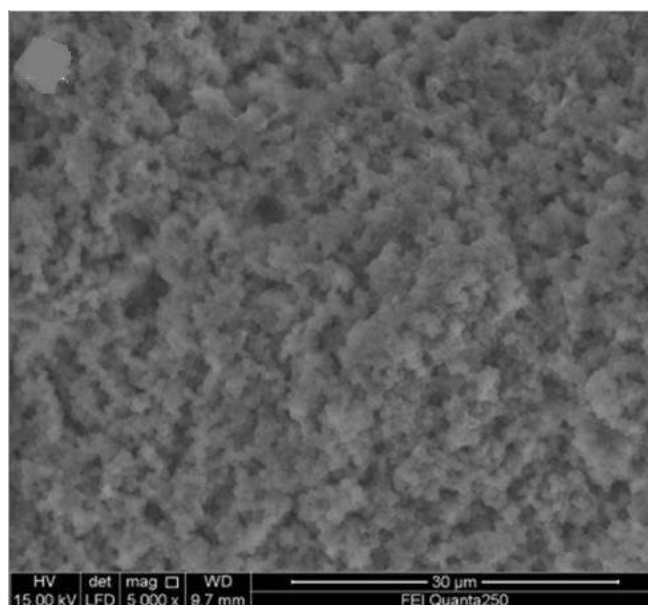
causador de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade, principalmente em pacientes femininas na faixa dos 16 aos 25 anos, onde causa cerca de 42% de todas as infecções. Isso deve-se ao fato de que mais de 40% das mulheres jovens e sexualmente ativas possuem o *S. saprophyticus* em sua microbiota genitourinária (HUR *et al.*, 2016; NATSIS *et al.*, 2018). Entre todas as espécies do gênero *Staphylococcus*, *S. saprophyticus* é a única considerada tipicamente uropatogênica, por conta da sua capacidade de aderir às células uroepiteliais e crescer persistentemente no trato urinário, uma vez que essa bactéria possui diversos fatores de virulência que contribuem para essa adesão e consequente colonização e patogenicidade, como a presença de algumas proteínas de superfície chamadas de fatores de uro-aderência e proteínas associadas à parede celular, como ureases e D-serina aminases (KING *et al.*, 2012; PAIVA-SANTOS *et al.*, 2018). Outro fator que contribui diretamente para a virulência e patogenicidade do *S. saprophyticus* se trata da capacidade de algumas cepas dessa espécie de formar biofilmes, principalmente em pacientes cateterizados, aumentando assim a gravidade da infecção; ainda, tem sido relatado o surgimento de resistência a antibióticos usados para o tratamento dessas infecções, como a vancomicina (EHLERS *et al.*, 2020).

Staphylococcus aureus se trata de uma bactéria Gram-positiva que habita comensalmente a microbiota humana, onde se estima que cerca de 25% a 40% da população já teve sua via nasal colonizada por esse micro-organismo em algum momento da vida (TONG *et al.*, 2015). Apesar de ser comensal, *Staphylococcus aureus* é um dos maiores micro-organismos oportunistas causadores de infecções bacterianas em humanos, podendo invadir e causar infecções em diversos tecidos e órgãos do corpo humano, tais como pneumonia, osteomielite, endocardite, infecções da pele e de tecidos moles, artrite séptica, fascite necrosante, síndrome do choque tóxico, infecções urinárias, bacteremias, entre várias outras (DAVID *et al.*, 2017). Essa capacidade de invadir, se adaptar e de causar infecções em diversos tecidos e órgãos diferentes do hospedeiro se deve principalmente ao grande número de genes reguladores e produtores de fatores de virulência que o *Staphylococcus aureus* possui. Esses fatores incluem desde componentes de superfície celular até proteínas, toxinas e enzimas extracelulares que vão auxiliar na aderência às células do hospedeiro, evasão do sistema imune, degradação e aquisição de nutrientes, o que irá contribuir para a sobrevivência e patogenicidade (POLLIT *et al.*, 2018; JENUL *et al.*, 2019).

Alem disso, diversas pesquisas já têm relatado o surgimento de diversas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes aos mais variados antibioticos comerciais, tais como β -lactâmicos, meticilina, oxacilina, vancomicina, daptomicina, tetraciclinas e até cepas multiresistentes (MULLER et al., 2015; ZENG et al., 2016; FOSTER, 2017; WALSH et al., 2020). Esses genes de resistência podem ser obtidos de maneira horizontal ou através de elementos gênicos móveis e podem surgir desde alterações nos locais de ligação ao antibiotico, remodelação do envelope celular, produção de enzimas hidrolíticas, até o aumento de expressão de bombas de efluxo (FOSTER, 2017). A cepa resistente mais comumente encontrada em infecções se trata da *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que está associada a diversos tipos de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade ao redor do mundo, com alto índice de mortalidade e tempo de internação. MRSA pode causar morbidades em diversos tecidos, sendo mais comum as infecções de pele e tecidos subcutâneos, mas também sendo encontrada comumente em osteomielite, meningite, pneumonia, abscessos pulmonares, enfisema e bacteremia (SIT et al., 2017; LAKUNDHI et al. 2018; SIDDIQUI et al., 2019).

Staphylococcus aureus também possui a capacidade de formar biofilme (Figura 3) nos mais diversos dispositivos médicos, tais como implantes de válvulas cardíacas artificiais, próteses articulares, cateteres, implantes mamários e ortopédicos, o que pode levar ao aparecimento de infecções associadas a estes biofilmes e consequente aumento de morbidade e mortalidade dos indivíduos acometidos, sendo necessária frequentemente remoção cirúrgica do dispositivo infectado e maior tempo de hospitalização (MOORMEIER et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). O maior problema no aumento da incidência de infecções por *S. aureus* associadas a biofilmes é a maior resistência a antibioticos e ao sistema imune do hospedeiro, seja através da ação de barreira da matriz polissacarídica e/ou seja pelas condições anóxicas e com baixa taxa de nutrientes dentro do biofilme, o que leva as células de *S. aureus* a se tornarem persistentes e de crescimento lento, impedindo a ação da maioria dos antibióticos. Por conta disso, se torna necessário o desenvolvimento de novos métodos capazes de tratar esses tipos de infecções (CHUNG et al., 2014; SINGH et al., 2016; SURESH et al., 2019).

Figura 3: Biofilme de *Staphylococcus aureus* (Microscopia Eletrônica de varredura)



Fonte: Adaptado de Shi et al. (2016)

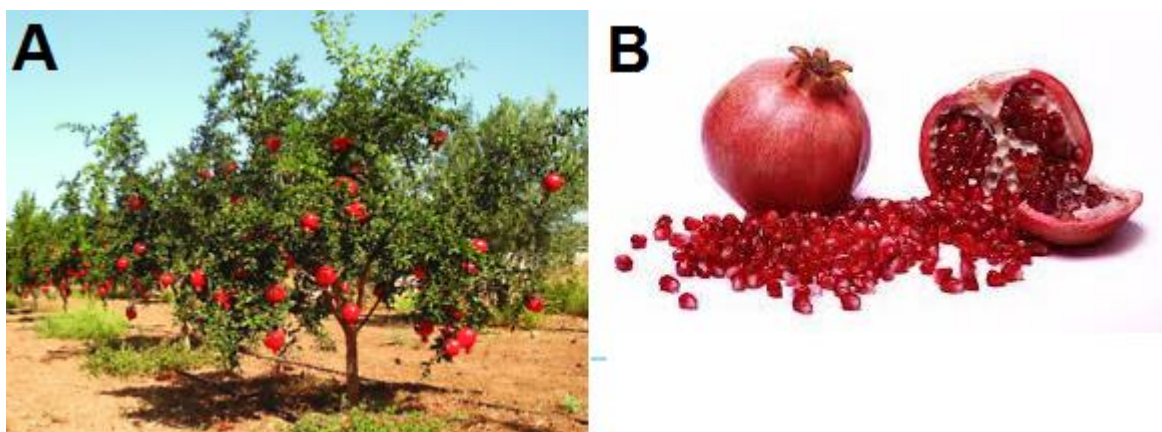
3.6 Lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL)

Punica granatum L. (Figura 4), também conhecida popularmente como romãzeira, se trata de um arbusto de folhas caducas, nativo do Irã, mas distribuído mundialmente e sendo amplamente usado na medicina tradicional (AKBARPOUR et al., 2009). O fruto, conhecido como romã, possui propriedades medicinais, como atividades anti-inflamatórias e antibacterianas. O óleo da semente tem efeito inibitório em neoplasias de pele e de mama, além de possuir compostos fenólicos com forte atividade antioxidante (SHAYGANIA et al., 2016). Os sucos e as sementes são considerados um potente tônico para garganta e para o coração, além de serem usados para interromper sangramentos no nariz e na gengiva e no tratamento de hemorroidas (MERCOLA, 2015).

Diversos potenciais terapêuticos de *P. granatum* e seus metabólitos têm sido descritos, tais como o ácido elágico extraído da romã, que tem capacidade de modular microRNAs responsáveis pelo surgimento de câncer colorretal (NUNEZ-SANCHEZ et al., 2015). Outros relatos incluem potencial antidiabético e hipoglicêmico do extrato hidroalcoólico das folhas e da casca do fruto (SALWE et al., 2015), potencial antibacteriano da farinha da casca do fruto contra *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella* spp. (GULLON et al., 2016), entre vários outros.

Da sarcotesta da romã foi isolada uma lectina, denominada PgTeL, que é uma proteína ligadora de quitina de 26 kDa, que demonstrou atividade bactericida e bacteriostática contra *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* e *Streptococcus mutans* e bacteriostática contra *Aeromonas* sp., *Enterococcus faecalis*, diversas cepas de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, em concentrações que variam de 1,25 até 100 µg/mL. Ainda, foi capaz de reuzir a capacidade de adesão e invasão de *Aeromonas* sp., *S. aureus*, *S. marcescens*, *S. enterica* e *L. monocytogenes* em células HeLa (SILVA et al., 2016, 2019a, 2019b, 2021). Ainda, possui potencial antifúngico contra *Candida albicans* e *Candida krusei* (SILVA et al., 2018) e inibiu a formação de biofilme por *C. albicans*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e cepas de *E. coli* produtoras de β-lactamase (SILVA et al., 2018, 2019a, 2019b, 2021).

Figura 4: *Punica granatum* (A) e o fruto contendo a sarcotesta de *Punica granatum* (B).



Fonte: www.ateliardobonsai.com.br

3.7 Lectina de *Calliandra surinamensis* (CasuL)

Calliandra surinamensis (Wall.) (Figura 5), popularmente conhecida como esponjinha rosa ou espanador-de-indio, se trata de um arbusto tropical perene de baixa ramificação da família Fabaceae, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do Sudeste asiático, África, Austrália e América. O pigmento das flores de *C. surinamensis* é utilizado folcloricamente como corante e tintura e, na medicina tradicional, a casca do caule é utilizada para tratar tosse, cicatrização de feridas, inflamação e atividades antimicrobianas (OMAR et al., 2013).

Potenciais terapêuticos de *C. surinamensis* vêm sendo relatados, tais como

para a fração solúvel em clorofórmio obtida do extrato metanólico das folhas, que apresentou atividade trombolítica em sangue humano periférico e efeito inibitório sobre o crescimento de *Salmonella typhi* (SIKDER et al., 2012). Falodun et al. (2010) demonstraram que alguns constituintes como glicosídeo de xantona e glicosídeo de flavanol, extraídos da casca do caule de *C. surinamensis*, demonstraram atividade antioxidante e o glicosídeo de xantona demonstrou também uma ação antitumoral contra linhagens celulares de câncer de pulmão.

Dos folíolos de *C. surinamensis* foi isolada uma lectina (CasuL), de caráter ácido e com massa molecular de 48 kDa, cujo enovelamento de estrutura terciária é resistente ao aquecimento. Essa lectina apresentou atividade citotóxica para células humanas de leucemia (K562) e câncer de mama (T47D), sem promover redução na viabilidade células normais. Ainda, CasuL apresentou atividade antifúngica contra *Candida krusei*, causando danos na parede celular, e ação bacteriostática e antibiofilme contra *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (tanto isolado não-resistente quanto isolado resistente à oxacilina) (PROCÓPIO et al., 2017); CasuL também foi capaz de inibir o crescimento de isolados de mastite bovina (Ss6PD e Sa) e caprina (Ss5D e Ssp01) do gênero *Staphylococcus*, bem como foi observado efeito sinérgico nas combinações CasuL-ampicilina contra Ssp01 e CasuL-tetraciclina contra Sa e Ssp6D; CasuL também foi capaz de reduzir a formação de biofilme pelos isolados Sa e Ss5D e, quando em combinação com tetraciclina e ampicilina, foi capaz de inibir a formação de biofilme por Ss6PD 2 Ssp01, respectivamente (PROCÓPIO et al., 2019).

Figura 5: *Calliandra surinamensis* (A) e folíolos de *Calliandra surinamensis* (B)



Fonte: www.ateliedobonsai.com.br

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese serão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

Capítulo de revisão aceito para publicação no livro “Understanding Antibiofilm Activity”.

Natural Products for Biofilm Control: Action Mechanisms and Innovative Proposals

Gustavo Ramos Salles Ferreira and Thiago Henrique Napoleão

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

Biofilms are microbial communities surrounded by an extracellular polymeric substance (EPS), formed from an intercellular communication mechanism called quorum sensing (QS). To form the biofilm, microorganisms attach to different types of surfaces such as tooth enamel, soil, plants, pipes, and medical devices. Biofilm formation provides protection against a variety of adverse conditions, including antimicrobial agents. Thus, biofilms have been related to persistent and chronic infections. In recent decades, new antimicrobial agents that can act to inhibit or eradicate these biofilms have been investigated. Natural products, mainly of plant and animal origin, have shown the ability to prevent and modulate the formation of biofilms by different species of microorganisms. They act by inhibiting EPS formation, suppressing adhesion and fixation on surfaces, and interfering with the QS mechanisms. In plants, these compounds (polyphenols, alkaloids, terpenes, peptides, and lectins, among others) can be extracted from different types of tissues and organs and may be in the form of mixtures (essential oils, extracts) or isolated. In animals, antimicrobial peptides and lectins found in different tissues have been

reported as antibiofilm molecules. Innovative strategies for application of these natural antibiofilm agents include production of functionalized films, nanoemulsions, nanoparticles, and nanocapsules. In addition, molecular docking and peptide engineering have been used to direct molecular modifications aiming to potentialize the bioactivities.

Keywords: plant extracts; secondary metabolites; lectins; antimicrobial peptides.

Introduction

Biofilms are defined as microbial communities encased in a self-produced polymeric matrix that adhere to solid surfaces or air-liquid interfaces, whether abiotic or biotic (Miquel et al., 2016; Slobodnikova et al., 2016). This matrix, or extracellular polymeric substance (EPS), is constituted of polysaccharides, lipids, proteins and nucleic acids and is directly linked to the architecture and cohesion of biofilms (Fleming and Wiender et al., 2010; Cortes et al., 2011). Cells in biofilms have different phenotypes from planktonic cells (i.e., non-adhered ones), with a greater capacity for colonization of surfaces, in addition to greater resistance to external stress (Macfarlane and Dillon, 2007).

Biofilm formation has as its main steps: (I) adhesion and fixation of the microbial community on the surface through structures such as flagella or through molecular interactions such as Van der Waals forces and electrostatic interactions; (II) the formation of micro-colonies through a process of microbial cell multiplication through chemical signals; (III) the formation and maturation of the biofilm through the expression of genes for the formation of EPS and communications between microbial cells through a system of auto inductive signals called quorum sensing (QS); and (IV) the dispersion of the biofilm, a stage where the microbial cells carry out a rapid multiplication and consequent dispersion, returning to the mobile form (Vasudevan, 2014; Jamal et al. 2018).

According to Ead et al. (2018), biofilms are responsible for more than 78.2% of persistent chronic wound infections that occur in humans. Furthermore, a high incidence of biofilm formation in medical devices such as catheters, orthopedic implants, contact lenses and implantable electronic devices has been reported (Romling et al. 2012; Percival, 2017). Microbial adhesion and consequent biofilm

formation on medical equipments and implants represent a major obstacle to the eradication of persistent infections. This is because one of the most important characteristics of biofilms is their resistance to the host's immune system and to antimicrobial agents (Busscher et al., 2012). The biofilm lifestyle can increase the resistance of microorganisms by decreasing the penetration of the antibiotic, production of virulence factors, and EPS action in capturing antimicrobial molecules and inactivating them through the production of enzymes (Høiby et al., 2010; Slobodnikova et al., 2016). It is known that bacterial cells in biofilms can tolerate up to 1,000 times higher concentrations of antibiotics than when they are in the planktonic form, which limits the therapeutic options (Buhmann et al., 2016).

Biofilms are involved in several human diseases, such as prostatitis, caries, rhinosinusitis, otitis media, cystic fibrosis, endocarditis, osteomyelitis, lung infections, and urinary infections (Percival, 2017; Gebreyohannes et al., 2019). For example, biofilms formed by *Enterococcus* spp. are frequently observed in urinary tract infections, wound infections, gastrointestinal tract, and endocarditis (Ch'ng et al., 2019). Biofilms are often composed of two or more microbial species, with each of these species bringing and transmitting unique characteristics that are not present in their monospecies biofilm counterparts (Flemming et al., 2016). Multispecies biofilms are widely found in medical devices (Kvich et al., 2020, Joshi et al., 2021). As an example, multispecies biofilms of uropathogenic bacteria such as *Proteus*, *Staphylococcus*, *Providencia* and *Ureaplasma* are often responsible for urinary tract infections associated with catheters and the consequent production of infectious stones (Norsworthy and Pearson, 2017).

Due to the high resistance to various antimicrobials, biofilms are usually clinically treated with a combination of different drugs, which, in turn, are usually quite aggressive (De La Fuente-Núñez et al., 2013). Because of this, recent studies have sought new strategies for preventing and eradicating biofilms (Howlim et al., 2015; Gugala et al., 2017). In an effort to find agents capable of preventing and eradicating biofilms, recent studies have evaluated natural products, including plant secondary metabolites (alkaloids, terpenes, polyphenols, tannins) as well as bioactive proteins and peptides of plant and animal origin (Sun et al., 2013; Song et al., 2018; Lu et al., 2019; Melander et al., 2020). In addition, the use of mixtures of different compounds has the advantage of bringing together different modes of action, thus becoming less favorable to the emergence of resistance compared to treatment with classic

antibiotics (Sun et al., 2013). Studies demonstrate the ability to combine physical methods, such as low-frequency ultrasound, with antibiotics for the removal and treatment of biofilms (Carmen et al., 2005; Dong et al., 2013).

Another target is the QS system that promotes communication between bacteria as well as modulating several genes, such as those responsible for the expression of virulence factors and formation of biofilm (Uroz et al., 2009). QS inhibitors could attenuate the action of self-inducing signals and therefore have been used both alone and in association with antibiotics (Sun et al., 2013). Natural compounds have shown anti-QS action, which will be discussed further in the next sections.

Natural products with antibiofilm action

Plant extracts, metabolites and essential oils

Extracts and essential oils derived from the most diverse plant tissues and organs have been shown to be effective alternatives against biofilms. Secondary metabolites are bioactive compounds produced by plants that, among other functions, act as defensive agents, protecting them against pathogens and pests present in the plant ecosystem (Song et al., 2018). Secondary metabolites such as polyphenols, flavonoids, phenolic acids, and tannins have already demonstrated antibiofilm activity (Table 1) (Slobodnikova et al., 2016). We present some reports from the literature of the antibiofilm activities of plant extracts and isolated metabolites according to the microbial species affected.

A methanol extract of *Marsdenia tinctoria* fruits demonstrates an intense ability to inhibit biofilm formation by AmpC β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* (Satish et al., 2014). Cyanidin, a secondary metabolite of the anthocyanin family, shows the ability to inhibit biofilm formation by *K. pneumoniae* through binding to the LasR protein receptor, which is a type 2 QS regulatory molecule involved in the formation of the biofilm by this bacterium (Gopu et al., 2016).

Studies have shown the ability of some plant extracts to reduce the adhesion of microbial cells to surfaces by inhibiting the production of water-insoluble glycans that directly contribute to the formation of biofilms by caries-causing microorganisms, such as *Streptococcus mutans* (Ooshima et al., 2000; Song et al., 2006). The polyphenols pinocembrin and apigenin, present in the Chilean Propolis extract, were

able to significantly reduce the biofilm production by *S. mutans* in synthetic models of caries plaques, even with higher activity than chlorhexidine (Veloz et al., 2019). *Acmella oleracea* extract rich in the compound spilanthol (a fatty acid amide) shows strong antibiofilm activity against *S. mutans*, promoting an inhibition of ca. 51% after only 1-min application. The authors considered this extract an affordable coadjuvant to prevent and control dental caries (Peretti et al., 2021). A systematic review conducted by Cardoso et al. (2021) highlighted the use of *Camellia sinensis* leaf extract as an adjuvant for the treatment of oral biofilms, including dental plaque and gingivitis; however, the authors pointed out that a better understanding of the mechanisms of action are needed to reach better results in clinical treatments.

Acroptilon repens ethanolic extract, as well as its chloroform, ethylacetate, and water fractions, shows antibiofilm activity and a decrease in the expression level of *exoA* gene (encoding exotoxin A) in *Pseudomonas aeruginosa*, and are considered new sources of compounds to fight nosocomial infections caused by drug-resistant strains of this bacterium (Akhhgari et al., 2021). Umbelliferon derivatives, found in plants of *Ferula* genus, show high antibiofilm activity against *P. aeruginosa*, but did not show anti-QS action as indicated by weak inhibition of QS-controlled production of the pigment violacein (Amin et al., 2020).

Methanolic extract of *Kalanchoe laxiflora* flowers exhibits antibiofilm activity against *Escherichia coli*. It was detected the presence of flavonoids, phenolic acids, gallotannins, alkaloids and fatty acid in this extract (Osman et al., 2021). *Polypodium vulgare* rhizome aqueous extract and osladin (a saponin) isolated from it have inhibitory effects on the survival and biofilm formation by *E. coli* (Gleńsk et al., 2019).

Oncocalyxone A, a benzoquinone obtained from *Auxemma oncocalyx*, gave antibiofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Silva et al., 2020). *Decoctions* from *Camellia sinensis* (non-fermented leaves and buds) and *Curcuma longa* (rhizomes) showed antibiofilm activity especially against *S. aureus*, inhibiting cell motility and violacein production. *C. longa* sample also disrupted signal reception of externally supplied acyl homoserine lactone, a signaling molecule involved in bacterial QS (Tamfu et al., 2020). In the study by Dong et al. (2018), tannic acid, a phenolic compound found in several plant species, was able to inhibit biofilm formation by *S. aureus*, both in sensitive and methicillin-resistant strains (MRSA). Trentin et al. (2011) demonstrated that aqueous extracts of plants from the Brazilian semi-arid region, such as branches and fruits of *Bauhinia acuruana* and

leaves of *Pityrocarpa moniliformis*, inhibited biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* by 77–81% at a concentration of 4 mg/mL.

The flavonoid curcumin was able to inhibit the formation of monospecies and multispecies biofilms by *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans*, binding to a regulatory molecule (BfmR), a response regulator in a two-component signal transduction system in this species (Raorane et al., 2019).

Saponins obtained from *Sapindus mukorossi* pulps, called sapindoside A and sapindoside B, showed antibiofilm activity against *Cutibacterium acnes*. Microscopy analysis revealed that the structure of biofilm was destroyed, with the thickness remarkably reduced. Average diffusion distance of biofilm also decreased significantly in treatments with saponins and there was a down-regulation in the expression of several biofilm-associated genes, including those encoding von Willebrand factor type A domains, proteins involved in EPS biosynthesis, and triacylglycerol lipase (Wei et al., 2022).

According to the European Pharmacopeia (7th edition), essential oils are defined as odorant products that have a complex composition and can be obtained from plant raw extract, either extracted by steam of water, dry distillation, or a suitable mechanical method without heating (El Asbahani et al., 2015). Essential oils have antimicrobial activity against the most diverse pathogens, being widely used in the food industry to extend the shelf life of products and protect against contamination by pathogens (Fратиanni et al., 2010; Kalemba et al., 2013). *Coriandrum sativum* essential oil caused a strong inhibition of biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* (Kacaniova et al., 2020). Schillaci et al. (2008) demonstrated that the essential oil from *Boswellia papyrifera* gives antibiofilm activity against *S. epidermidis* and *S. aureus* while the essential oil of *Cymbopogon nardus* and its major compound geraniol reduced the biofilm biomass of *S. aureus* up to 100% (Pontes et al., 2018).

Essential oil of *Tetragastris catuaba* leaves inhibit biofilm formation and planktonic growth of *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*, both in free and nanoemulsion-encapsulated forms. Its major compound, β -caryophyllene, was also evaluated in free and encapsulated form, but showed lower activity than the oil (Silva et al., 2021). An essential oil from *Citrus changshan-huyou* was also active on biofilm of *L. monocytogenes*, being able to decrease biomass and cellular activity. The authors also demonstrated that this oil caused extensive disruption of biofilm architecture and, using KEGG Annotation, found 23 differentially expressed genes

involved in QS pathways (Guo et al., 2019). Cinnamon and cardamom essential oils inhibited *E. coli* and *Bacillus subtilis* biofilms and the compound cinnamaldehyde was found to display the highest docking energy to interact with the biofilm matrix proteins RbmA and C receptors (Pourkhosravani et al., 2021).

A nanoemulsion produced from the essential oil of *Alhagi maurorum* was found to be active against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *Bacillus cereus* (Hassanhahian et al., 2020). Polyethylene-co-vinylacetate (EVA) films containing carvacrol or cinnamaldehyde reduced the biomass formed on polymeric films surface, compromise the normal biofilm development by *S. aureus* and *E. coli* (Nostro et al., 2012).

The antibiofilm effects of essential oils on fungi has also been described. The mandarin peel essential oil showed antibiofilm activity against *Aspergillus niger* as evidenced by absence of EPS, collapse of hyphae, disintegration of cytoplasmic organelles and folding of the cell membrane (Abdel-Aziz et al., 2019). The essential oil from *Boswellia rivaie* was able to both inhibit the formation of biofilms and to eradicate preformed *C. albicans* biofilms (Schillaci et al., 2008). Chifiriuc et al. (2012) evaluated nanoparticles containing *Rosmarinus officinalis* essential oil and found that they strongly inhibited the adherence ability and biofilm development by *C. albicans* and *Candida tropicalis* to a catheter surface. Table 1 shows other examples of secondary metabolites with antibiofilm action in addition to those discussed in the text.

Antimicrobial Peptides and Proteins

Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules usually formed by 15 to 30 amino acids that are part of the innate immune system of animals, plants, fungi and bacteria. They have the ability to bind to negatively charged molecules that make up the structure of the microbial membrane, inducing a large-scale failure or small defects that end up dissipating the transmembrane potential, causing cell death. They essentially act in cases of microorganisms with little or no growth rate, as in the case of those present in biofilms (Jorge et al., 2012). LLpepII, an AMP from *Linckia laevigata* (star fish), inhibited *C. albicans* biofilm formation without inhibiting the growth of the yeast cells (Seema and Shafreen, 2020).

Table 1. Other examples of secondary metabolites with antibiofilm action

Metabolite	Action	Microrganism	Reference
Asimicin	Anti-QS	<i>C. violaceum</i>	Tamfu et al. (2020)
Chalcone	Inhibition of oral biofilms	<i>Streptococcus mutans</i>	Wallock-Richards et al. (2015)
Coladonin	Biofilm formation inhibition	<i>Escherichia coli</i>	Lee et al. (2014)
Fisetin	Biofilm formation inhibition	<i>Staphylococcus aureus</i>	Durig et al. (2010)
Galic acid	Biofilm formation inhibition	<i>E. coli</i> <i>S. mutans</i>	Gao et al. (2015)
N-Cerotoyltryptamine	Anti-QS	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Tamfu et al. (2020)
Reserpin	Biofilm formation inhibition	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magesh et al. (2013)

AMPs are very interesting molecules to be explored in the search for antibiofilm agents to replace conventional antibiotics as their synthetic analogues, called peptidomimetics, are easier to produce, as well as have a distinct mode of action, being active against strains resistant to current antibiotics (Andrea et al., 2018; Von Borowski et al., 2018). A synthetic peptide derived from a mixture of two lactoferricin-derived peptides (human GRRRRSVQWCA and bovine lactoferrampin) was effective at low concentrations in preventing biofilm formation and, in some cases, even eradicating pre-existing biofilm of the PAO1 strain of *P. aeruginosa* (Ramamourthy and Vogel, 2021).

A modification of the AMP EeCentrocin 1, from the sea-urchin *Echinus esculentus*, was made by truncating 17 amino acids in its longer chain, originating a derivative called EC1-17KV. The EC1-17KV affected *C. albicans* membrane fluidity, increasing membrane permeabilization and reducing hyphal formation, leading to

suppression of biofilm formation (Ma et al., 2020). In another example, a series of halogenated derivatives of the antimicrobial peptide jelleine-I, from the royal jelly of *Apis mellifera*, were synthesized and evaluated for antibiofilm activity. All molecules showed antibiofilm activity against *S. aureus*, but the chlorine, bromine, and iodine derivatives were more efficient than the fluorine derivative (Jia et al., 2019).

Certain classes of proteins have shown varied and intense antibiofilm activity. Lectins, found in the most varied plant tissues, as well as in animals and microorganisms, are proteins with the capacity to reversibly bind carbohydrates or glycoconjugates and have shown an antibiofilm action. They can act through mechanisms such as interrupting the polymerization of EPS, preventing biofilm formation; affecting the viability of microbial cells; reducing the expression of genes related to QS mechanisms; and interacting with surfactants, enzymes and polysaccharides involved in biofilm production (Saha et al., 2014 Procópio et al., 2017; Coelho et al., 2018).

A study conducted by Vasconcelos et al. (2014) demonstrated that lectins extracted from plants and algae *Cratylia floribunda*, *Vatairea macrocarpa*, *Bauhinia bauhinioides*, *Bryothamnion seaforthii* and *Hypnea musciformis* inhibit the growth of cells of *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *C. tropicalis* both in their planktonic forms and in biofilms. PgTeL, a chitin-binding lectin isolated from the pomegranate (*Punica granatum*) fruit sarcotesta, showed antifungal activity against *C. albicans* and *Candida krusei*, and also inhibited biofilm formation by *C. albicans*. Furthermore, PgTeL inhibited biofilm formation by *S. aureus*, *L. monocytogenes* and β -lactamase-producing *E. coli* isolates (Silva et al., 2018, 2019a, 2019b, 2021). Procópio et al. (2017) demonstrated that *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL) was able to significantly inhibit biofilms formed by a strain of *S. aureus* resistant to oxacillin and by *Staphylococcus saprophyticus*. Biofilm formation by non-resistant *S. aureus* isolate and *C. albicans* was also remarkably inhibited by *Alpinia purpurata* inflorescence lectin (Ferreira et al., 2018).

The water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) demonstrates the ability to penetrate and damage the cells of preformed *Serratia marcescens* biofilms and to reduce the number of cells in the biofilm of *Bacillus* sp. In addition, it was able to control biofilm formation on a glass surface, damaging *S. marcescens* cells and preventing *Bacillus* sp. adherence (Moura et al., 2017).

Recently, Subramaniyan et al. (2021) reported that N-myristoyltaurine capped silver nanoparticles functionalized with jacalin (the lectin from the *Artocarpus integrifolia* seeds) displayed excellent biofilm inhibitory activity, reducing both bio-volume and average biofilm thickness. The authors also demonstrated by microscopy inhibition of EPS synthesis and that cells were intact and live, suggesting a true anti-biofilm activity.

Concerning animal lectins, the type C lectin from *Bothrops jararacussu* venom shows the ability to break a pre-formed *S. epidermidis* biofilm in a time-dependent manner. In addition, the lectin inhibited biofilm formation of several mastitis-causing pathogens, including different strains of *S. aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Streptococcus agalactiae* and *E. coli* (Klein et al., 2015). Lectins from shrimp *Penaeus semisulcatus* and serum of the pearl spot *Etroplus suratensis* disrupted biofilm formation by the aquatic pathogens *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila* (Rubeena et al., 2019; Preetham et al., 2020). Lectins from the marine sponges *Aplysina fulva* and *Chondrilla caribensis* reduced the biomass of biofilm produced by *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *E. coli* (Marques et al., 2018; Carneiro et al., 2019). Also, a lectin from the hemolymph of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus* disrupts the biofilm architecture of Gram-negative bacteria (Jayanthi et al., 2017).

Conclusions

Natural products from plant and animal origin show the ability to prevent and modulate the formation of biofilms by bacteria and fungi. The full and detailed mechanisms still need to be understood for most of the compounds, but evidence points to disruption of EPS architecture formation, modulation of biofilm-associated gene expression and binding to QS system components. Innovative strategies for application of these natural antibiofilm agents include production of functionalized films, nanoemulsions, nanoparticles, and nanocapsules. In addition, molecular docking and peptide engineering have been used to direct molecular modifications aiming to potentialize the bioactivities.

References

- Abdel-Aziz, M. M., Emam, T. M. and Elsherbiny, E. A. (2019). Effects of mandarin (*Citrus reticulata*) peel essential oil as a natural antibiofilm agent against *Aspergillus niger* in onion bulbs. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110959.
- Achudhan, D., Vijayakumar, S., Malaikozhundan, B., Divya, M., Jothirajan, M., Subbian, K. and Vaseeharan, B. (2020). The antibacterial, antibiofilm, antifogging and mosquitocidal activities of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles green-synthesized using multiple plants extracts. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8, 104521.
- Akhgari, Z., Nazari, R., Zargar, M. and Tanomand, A. (2021). Antibacterial and antibiofilm properties of *Acroptilon repens* (L.) Dc extract and its effect on exotoxin A gene expression of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Reports*, 25, 101357.
- Amin, A., Hanif, M., Abbas, K., Ramzan, M., Rasheed, A., Zaman, A. and Pieters, L. (2020). Studies on effects of umbelliferon derivatives against periodontal bacteria; antibiofilm, inhibition of quorum sensing and molecular docking analysis. *Microbial Pathogenesis*, 144, 104184.
- Andrea, A., Molchanova, N. and Jenssen, H. (2018). Antibiofilm peptides and peptidomimetics with focus on surface immobilization. *Biomolecules*, 8, 27.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Buhmann, M. T., Stiefel, P., Maniura-Weber, K. and Ren, Q. (2016). In vitro biofilm models for device-related infections. *Trends in Biotechnology*, 34, 945-948.
- Busscher, H. J. and van der Mei, H. C. (2012). How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS pathogens*, 8, e1002440.
- Carneiro, R. F., Viana, J. T., Torres, R. C. F., da Silva, L. T., Andrade, A. L., de Vasconcelos, M. A. and Sampaio, A. H. (2019). A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 662, 169-176.
- Ch'ng, J. H., Chong, K. K., Lam, L. N., Wong, J. J. and Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 82-94.
- Chifiriuc, C., Grumezescu, V., Grumezescu, A. M., Saviuc, C., Lazăr, V. and Andronescu, E. (2012). Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Research Letters*,

7, 209.

- Coelho, L.C.B.B., Silva, M.S., de Oliveira, W.F., de Moura, M.C., Pontual, E.V., Gomes, F.S., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H. and Correia, M.T.S. (2018) Lectins as antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 1238-1252.
- Cortes, M.E., Consuegra, J. and Sinisterra, R.D. (2011) Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. In: Mendez-Villas, A. (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex Research Centre, Badajoz, pp. 896-905.
- Silva, R. C. S., de Souza Arruda, I. R., Malafaia, C. B., de Moraes, M. M., Beck, T. S., da Camara, C. A. G., Silva, N. H., Silva, M. V., Correia, M. T. S., Frizzo, C. P. & Machado, G. (2021). Synthesis, characterization and antibiofilm/antimicrobial activity of nanoemulsions containing *Tetragastris catuaba* (Burseraceae) essential oil against disease-causing pathogens. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 102795.
- Silva, R. E., Ribeiro, F. D. O. S., de Carvalho, A. M. A., Daboit, T. C., Marinho-Filho, J. D. B., Matos, T. S., Pessoa, O. D. L., Leite, J. R. S. A., Araújo, A. R. and Soares, M. J. S. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activity of the benzoquinone oncocalyxone A. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104513.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. and Hancock, R.E.W. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 580-589.
- Dong, G., Liu, H., Yu, X., Zhang, X., Lu, H., Zhou, T. and Cao, J. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 32, 2225-2228.
- Cardoso, V. F. S., Roppa, R. H. A., Antunes, C., Moraes, A. N. S., Santi, L. and Konrath, E. L. (2021). Efficacy of medicinal plant extracts as dental and periodontal antibiofilm agents: A systematic review of randomized clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114541.
- Durig, A., Kouskoumvekaki, L., Vejborg, R. M. and Klemm, P. (2010). Chemoinformatics-assisted development of new anti-biofilm compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 309–317.
- Ead, J. K., Snyder, R. J., Wise, J., Cuffy, C., Jafary, H. and Fischborn, K. (2018). Is PASH Syndrome a Biofilm Disease? A Case Series and Review of the Literature. *Wounds*, 30, 216-223.

- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R. and Elaissari, A (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220-243.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Fратиanni, F., de Martino, L., Melone, A., de Feo, V., Coppola, R. and Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75, M528–M535.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C. and Sbhatu, D. B. (2019). Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*, 5, e02192.
- Gleńsk, M., Tichaczek-Goska, D., Środa-Pomianek, K., Włodarczyk, M., Wesolowski, C. A. and Wojnicz, D. (2019). Differing antibacterial and antibiofilm properties of *Polypodium vulgare* L. rhizome aqueous extract and one of its purified active ingredients—osladin. *Journal of Herbal Medicine*, 17-18, 100261.
- Gopu, V. and Shetty, P.H. (2016). Cyanidin inhibits quorum signalling pathway of a food borne opportunistic pathogen. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 968- 976.
- Gugala, N., Lemire, J.A., Turner, R.J. (2017). The efficacy of different anti-microbial metals at preventing the formation of, and eradicating bacterial biofilms of pathogenic indicator strains. *The Journal of Antibiotics*, 70, 775-780.
- Guo, J., Gao, Z., Li, G., Fu, F., Liang, Z., Zhu, H. and Shan, Y. (2019). Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from *Citrus Changshan-huyou* YB chang against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 105, 256-264.
- Hassanshahian, M., Saadatfar, A. and Masoumipour, F. (2020). Formulation and characterization of nanoemulsion from *Alhagi maurorum* essential oil and study of its antimicrobial, antibiofilm, and plasmid curing activity against antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18, 1015-1027.
- Højby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 322–332.
- Howlin, R. P., Brayford, M. J., Webb, J. S., Cooper, J. J., Aiken, S. S. and Stoodley,

- P. (2015). Antibiotic-loaded synthetic calcium sulfate beads for prevention of bacterial colonization and biofilm formation in periprosthetic infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 111-120.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. and Kamil, M. A., (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 7-11.
- Jayanthi, S., Ishwarya, R., Anjugam, M., Iswarya, A., Karthikeyan, S. and Vaseeharan, B. (2017). Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties. *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 227-237.
- Jia, F., Zhang, Y., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Zhang, L., Yao, H., Ni, J. and Wang, K. (2019). The effect of halogenation on the antimicrobial activity, antibiofilm activity, cytotoxicity and proteolytic stability of the antimicrobial peptide Jelleine-I. *Peptides*, 112, 56-66.
- Jorge, P., Lourenço, A. and Pereira, M.O. (2012). New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. *Biofouling*, 28, 1033-1061.
- Kačániová, M., Galovičová, L., Ivanišová, E., Vukovic, N. L., Štefániková, J., Valková, V. and Tvrdá, E. (2020). Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil for its application in foods. *Foods*, 9, 282.
- Kalemba, D. and Knicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira, L. L., Feio, R. N., Malouin, F. and Ribon, A. D. O. B. (2015). A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts Staphylococcal biofilms, *PLoS ONE*, 10, e0120514.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Cho, H. S., Ryu, S. Y., Cho, M. H. and Lee, J. (2014). Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Phytomedicine*, 21, 1037–1042.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y. and Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, 14, 11.
- Ma, L., Ye, X., Sun, P., Xu, P., Wang, L., Liu, Z. and Zhou, C. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activity of the EeCentrocin 1 derived peptide EC1-17KV via

- membrane disruption. *EBioMedicine*, 55, 102775.
- Macfarlane, S. and Dillon, J. F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1187–1196.
- Magesh, H., Kumar, A., Alam, A., Priyam, Sekar, U., Sumatran, V.N. and Vaidyanathan, R. (2013). Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 764-772.
- de Almeida, A.S., de Oliveira Sousa, A.R., Pereira, R., Andrade, A.L., Chaves, R.P., Carneiro, R.F., de Vasconcelos, M.A., do Nascimento-Neto, L.G., Pinheiro, U. and Videira, P.A., (2018). Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1292-1301.
- Melander, R. J., Basak, A. K. and Melander, C. (2020). Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural Product Reports*, 37,1454-1477.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B. and Forestier, C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. *Frontiers in Microbiology*, 7, 592.
- Moura, M.C., Trentin, D.S., Napoleão, T.H., Primon-Barros, M., Xavier, A.S., Carneiro, N.P., Paiva, P.M.G., Macedo, A.J. and Coelho, L.C.B.B. (2017). Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm, and anti-adhesive properties. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 861-874.
- Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A. and Bisignano, G. (2012). Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1029-1038.
- Ooshima, T., Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., Matsumura, M., Sobue, S. and Matsumoto, M. (2000) Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. *Archives of Oral Biology*, 45, 639- 645.
- Osman, E. E., Mohamed, A. S., Elkhateeb, A., Gobouri, A., Abdel-Aziz, M. M. and Abdel-Hameed, E. S. S. (2021). Phytochemical investigations, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antibiofilm activities of *Kalanchoe laxiflora* flowers. *European Journal of Integrative Medicine*, 49, 102085.
- Paiva, P. M. G., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Sá, R. A., Correia, M. T. S. and

- Coelho, L. C. B. B. (2010). Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.). Current Research, Technology, and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex Research Center, Badajoz, pp. 396-406.
- Percival, S. L., Hill, K. E., Williams, D. W., Hooper, S. J., Thomas, D. W. and Costerton, J. W. A (2012). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20, 647-657.
- Peretti, P., Rodrigues, E. T., Souza Junior, B. M., Bezerra, R. M., Fernández, E. G., Sousa, F. F. O. and Pinheiro, M. T. (2021). Spilanthol content of *Acmella oleracea* subtypes and their bactericide and antibiofilm activities against *Streptococcus mutans*. *South African Journal of Botany*, 143, 17-24.
- Pontes, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., de Carvalho, M. G., Júnior, F. E. A. C. and Cavalcante, T. T. A. (2019). Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 28, 633-639.
- Pourkhosravani, E., Dehghan Nayeri, F. and Mohammadi Bazargani, M. (2021). Decoding antibacterial and antibiofilm properties of cinnamon and cardamom essential oils: a combined molecular docking and experimental study. *AMB Express*, 11, 143.
- Preetham, E., Lakshmi, S., Wongpanya, R., Vaseeharan, B., Arockiaraj, J. and Olsen, R. E. (2020). Antibiofilm and immunological properties of lectin purified from shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 776-782.
- Procópio, T.F., Patriota, L.L.S., Moura, M.C., Silva, P.M., Oliveira, A.P.S., Carvalho, L.V.N., Lima, T.A., Soares, T., Silva, T.D., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G. and Napoleão, T.H. (2017). CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 419-429.
- Ramamourthy, G. and Vogel, H. J. Antibiofilm activity of lactoferrin-derived synthetic peptides against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. (2021). *Biochemistry and Cell Biology*, 99, 138-148.
- Raorane, C. J., Lee, J. H., Kim, Y. G., Rajasekharan, S. K., García-Contreras, R. and Lee, J. (2019). Antibiofilm and antivirulence efficacies of flavonoids and curcumin

- against *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 990.
- Romling, U. and Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of International Medicine*, 272, 541-561.
- Saha, R.K., Acharya, S., Jamiruddin, M., Roy, P., Islam, M.D.S., and Shovon, S.S.H. (2014). Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *The Journal of Phytopharmacology*, 3, 44-51.
- Satish, K.R., Ramesh, S., Sucharitha, K.M., Vinoth, J. (2014). Antibiofilm activity of *Morinda tinctoria* fruit extracts against AmpC-lactamase positive *Klebsiella pneumoniae*. *Der Pharmacia Lettre*, 6, 160-165.
- Schillaci, D., Arizza, V., Dayton, T., Camarda, L. and Stefano, V. D. (2008). In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 433-438.
- Shao, D., Li, J., Li, J., Tang, R., Liu, L., Shi, J., Huang, Q. and Yang, H. (2015). Inhibition of gallic acid on the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Journal of Food Science*, 80, 1299–1305.
- Siddharthan, S. and Rajamohamed, B. S. (2020). Investigation of potential antibiofilm properties of Antimicrobial Peptide (AMP) from *Linckia laevigata* against *Candida albicans*: An in vitro and in vivo study. *Process Biochemistry*, 99, 340-347.
- Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J. and Trentin, D.S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical Reviews*, 116, 9162–9236.
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendecková, K., Kováč, J. and Mučaji, P. (2016). Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, 21, 1717.
- Song, J.H., Kim, S.K., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K. and Jeon, J.G. (2006). In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology*, 51, 1131-1140.
- Song, X., Xia, Y. X., He, Z. D. and Zhang, H. J. (2018). A review of natural products with anti-biofilm activity. *Current Organic Chemistry*, 22, 789-817.
- Subramaniam, S. B., Megarajan, S., Dharshini, K. S. and Veerappan, A. (2021). *Artocarpus integrifolia* seed lectin enhances membrane damage, oxidative stress and biofilm inhibition activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 624,

126842.

- Sun, F., Qu, F., Ling, Y., Mao, P., Xia, P., Chen, H. and Zhou, D. (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, 8, 877-886.
- Tamfu, A. N., Ceylan, O., Fru, G. C., Ozturk, M., Duru, M. E. and Shaheen, F. (2020). Antibiofilm, antiquorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon. *Microbial Pathogenesis*, 144, 104191.
- Tamfu, A. N., Ceylan, O., Kucukaydin, S. and Duru, M. E. (2020). HPLC-DAD phenolic profiles, antibiofilm, anti-quorum sensing and enzyme inhibitory potentials of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze and *Curcuma longa* L. *LWT*, 133, 110150.
- Trentin, D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., da Silva, A.G., da Silva, M.V., Correia, M.T.S., Baumvol, I.J.R. and Macedo, A.J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J. Ethnopharmacol*, 137, 327-335.
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1, 84-98.
- Veloz, J. J., Alvear, M. and Salazar, L. A. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* of individual and mixtures of the main polyphenolic compounds found in Chilean propolis. *BioMed Research International*, 2019, 7602343.
- Von Borowski, G.R., Gnoatto, S. C. B., Macedo, A. J. and Gillet, R. (2018). Promising antibiofilm activity of peptidomimetics. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2157.
- Walloch-Richards, D.J., Marles-Wright, J., Clarke, D.J., Maitra, A., Dodds, M., Hanley, B. and Campopiano, D.J. (2015). Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. *Chemical Communications*, 52, 10483–10485.
- Wei, M. P., Yu, H., Guo, Y. H., Cheng, Y. L., Xie, Y. F. and Yao, W. R. (2021). Synergistic combination of Sapindoside A and B: A novel antibiofilm agent against *Cutibacterium acnes*. *Microbiological Research*, 254, 126912.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M. and Robert, V. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology*, 11, 61.

4.2. ARTIGO 2

Atividade antibiofilme da lectina de *Calliandra surinamensis* (CasuL) frente biofilmes multicepas e multiespécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*

Gustavo Ramos Salles Ferreira¹, Pollyanna Michelle da Silva¹¹, Thamara Figueiredo Procópio¹, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Maiara Celine de Moura¹, Thiago Henrique Napoleão¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Resumo

Infecções associadas ao desenvolvimento de biofilmes bacterianos representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública. As bactérias em biofilmes apresentam elevada resistência ao sistema imune do hospedeiro e à antibioticoterapia convencional. Nesse contexto, compostos bioativos isolados de plantas têm sido estudados para suprir a necessidade de novos agentes com ação antibiofilme. Atividades antibacteriana e antibiofilme já foram relatadas para a lectina de folíolos de *Calliandra surinamensis* (CasuL). Esse trabalho investigou a capacidade de CasuL em inibir a formação de biofilme multicepas e multiespécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*, tanto isoladamente quanto em conjunto com antibióticos comerciais (ceftazidima, cefotixina e oxacilina). Vinte combinações de dois isolados de *S. aureus* ou *S. saprophyticus* se mostraram forte formadoras de biofilme. Quando testados isoladamente contra essas vinte combinações, CasuL e os antibióticos não apresentaram capacidade inibitória na formação de biofilmes multicepa ou multiespécie. Porém, quando em conjunto com o antibiótico ceftazidima, CasuL inibiu significativamente a formação de biofilme multicepas por *S. aureus* UFPEDA-670 + MRSA e por *S. aureus* UFPEDA-670 + 8325-4. Sendo assim, a combinação de CasuL e ceftazidima pode ter aplicabilidade na inibição da formação de biofilmes multicepas por *S. aureus*.

Introdução

Biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos em superfícies naturais ou sintéticas, formando uma estrutura tridimensional constituída por uma substância polimérica extracelular. Essa substância contém proteínas, lipídeos e polissacarídeos e confere aos microrganismos uma maior proteção e resistência contra agentes antimicrobianos, sistema imunológico de hospedeiros e estresses ambientais (USHA et al., 2010; PERCIVAL et al., 2012). Os biofilmes têm sido encontrados em diversos casos de infecções crônicas em pacientes com fibrose cística, otite média, cárie dentária e prostatite, além de infecções agudas; ainda, estão relacionados com contaminações nos mais variados dispositivos médicos (HOOPER et al., 2011). Uma vez formados, os biofilmes são difíceis de erradicar; sendo assim, a estratégia de tratamento mais importante consiste na prevenção do desenvolvimento do biofilme (GLINEL et al. 2012). Nesse contexto, pesquisas têm sido realizadas visando modificações de superfície de biomateriais com compostos bioativos visando prevenir a adesão bacteriana a substratos abióticos (BUSSCHER et al., 2012; TRENTIN et al., 2015).

Os produtos naturais constituem uma diversidade estrutural e funcional de moléculas bioativas, sendo avaliados como uma importante fonte de agentes terapêuticos inovadores e eficazes, desempenhando um papel extremamente importante na descoberta e no processo de desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN & CRAGG, 2012). Dentro do contexto do combate a biofilmes, a busca por agentes naturais capazes de impedir a formação de biofilmes e/ou promover a destruição desses tem ganhado destaque no cenário científico. A imobilização de compostos naturais isolados de plantas em superfícies inertes de dispositivos médicos representa uma abordagem promissora, principalmente porque esses compostos, em geral, são biocompatíveis e não tóxicos (GLINEL et al. 2012; FLETCHER et al. 2014; TRENTIN et al., 2015). Proantocianidinas isoladas de folhas de *Pityrocarpa moniliformis* foram capazes de aderir a superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, prevenindo assim a adesão de células de *Staphylococcus epidermidis* (TRENTIN et al. 2015). Adicionalmente, superfícies recobertas com concentrações subinibitórias de capsaicina e ácido zostérico, isolados a partir de pimenta e *Zostera marina*, respectivamente, apresentaram efeito antiaderente contra *Pseudomonas putida* (XU et al. 2005).

Lectinas, proteínas que ligam carboidratos, são amplamente distribuídas em plantas e apresentam diversas atividades biológicas, incluindo ação antibacteriana e antibiofilme (KLAFKE *et al.* 2013; DIAS *et al.* 2015). A atividade antibiofilme de lectinas pode envolver a capacidade dessas moléculas em alterar a viabilidade das células, interagir com constituintes presentes na matriz exopolimérica do biofilme, interrompendo sua polimerização, e inibir sinais *quorum sensing*, que são essenciais no processo de comunicação intercelular necessário para a formação de biofilmes e expressão da virulência (ISLAM *et al.* 2009; KLAFKE *et al.* 2013). A lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* foi capaz de inibir o crescimento e reduzir a viabilidade celular de *S. aureus* e *S. epidermidis*, efeitos que impediram a formação de biofilmes (VASCONCELOS *et al.*, 2014). A lectina de sementes de *Trigonella foenumgraecum* foi capaz de erradicar biofilmes pré-formados de *Streptococcus mutans*, alterando a morfologia celular e causando destruição da matriz (ISLAM *et al.*, 2009).

Calliandra surinamensis é uma planta da família Fabaceae conhecida popularmente como “espanador-de-índio” ou “esponjinha rosa”, cujos folíolos contêm uma lectina denominada CasuL (*C. surinamensis* lectin). CasuL é uma proteína acídica de 48 kDa, cuja estrutura terciária resistente ao aquecimento. Essa lectina apresentou atividade citotóxica para células humanas de leucemia (K562) e câncer de mama (T47D), sem promover redução na viabilidade células normais. Ainda, CasuL apresentou atividade antifúngica contra *Candida krusei*, causando danos na parede celular, e ação bacteriostática e antibiofilme contra *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (tanto isolado não-resistente quanto isolado resistente à oxacilina) (PROCÓPIO *et al.*, 2017). CasuL também foi capaz de inibir o crescimento de isolados de mastite bovina e caprina do gênero *Staphylococcus*, bem como foi capaz de reduzir a formação de biofilme por dois isolados (PROCÓPIO *et al.*, 2019).

O presente trabalho investigou a capacidade da lectina CasuL em inibir e erradicar a formação de biofilmes multicepas e multiespécies formados por isolados de *S. saprophyticus* e *S. aureus*.

Metodologia

Isolamento de CasuL

CasuL foi isolada através do procedimento estabelecido por Procópio *et al.* (2017). Para isolamento de CasuL, folhas de *C. surinamensis* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, com autorização (nº 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O acesso foi registrado (AAD9107) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Em seguida, os folíolos foram destacados e pulverizados em multiprocessador. O pó foi suspenso em NaCl 0,15 M (10%, p/v) e homogeneizado durante 16 h usando um agitador magnético. A seguir, a suspensão foi filtrada em gaze e centrifugada (12.000 g, 15 min, 4 °C) para obtenção do extrato bruto. O extrato foi tratado com sulfato de amônio a 60% de saturação conforme descrito por Green e Hughes (1955), durante 4 h sob agitação magnética. Depois desse período, o material foi centrifugado (3000 g, 15 min) e a fração precipitada (FP) foi coletada (3,0 mg de proteína) e aplicada em uma coluna (30 x 1 cm) de Sephadex G-75 equilibrada com NaCl 0,15 M. Após a aplicação da amostra, a lectina foi eluída com NaCl 0,15 M. A eluição de CasuL foi monitorada medindo a absorbância a 280 nm.

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL). Para avaliar a capacidade ligadora de carboidratos de CasuL, foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante (AH). Foi utilizada uma suspensão a 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho fixados com glutaraldeído (BING *et al.* 1967). Os eritrócitos foram coletados por meio de protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (processo 23076.033782/2015-70). No ensaio de AH, a amostra (50 µL) foi diluída serialmente (até 1:2048) em NaCl 0,15 M em microplacas de 96 poços. Em seguida, 50 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados a cada poço. Eritrócitos incubados com NaCl 0,15 M foram usados como controle. Após 45 min, a AH foi registrada como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação. A AH específica correspondeu à razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL).

Isolados bacterianos

Cepa-padrão de *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA-833 e isolados

clínicos sensíveis (UFPEDA-02 e 8325-4) e resistentes à oxacilina (UFPEDA-670, UFPEDA-671) e meticilina (MRSA, LACUSA 300) de *Staphylococcus aureus* foram obtidos a partir da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As culturas-estoque foram mantidas a -80°C em leite desnatado em pó estéril contendo 10% (v/v) de glicerol. Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio Mueller Hinton Ágar (MHA) overnight a 35°C e, posteriormente, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) para a obtenção de suspensão equivalente a 10^6 ou 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

Formação de biofilmes

A formação de biofilme multiespécie por *S. saprophyticus* e cada isolado de *S. aureus* e multicepa por cada dois isolados de *S. aureus* foi induzida segundo Procópio et al. (2017). Em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato, foram adicionados em cada poço 80 µL de água Milli-Q, 40 µL do meio de cultura (Caldo Mueller Hinton) e 80 µL da suspensão bacteriana, sendo 40 µL de cada uma das espécies/cepas testadas (10^8 UFC/mL; em solução salina estéril). A DO_{600} foi registrada no tempo zero e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, a DO_{600} foi obtida novamente a fim de se verificar o crescimento bacteriano. Para avaliar a formação de biofilme, os poços foram lavados com NaCl a 0,9% estéril (três vezes) e os biofilmes (células aderidas à placa de poliestireno) foram incubados a 60 °C por 60 min para fixação. Em seguida, foi adicionado cristal violeta 0,4% (p/v) e o ensaio foi incubado por 15 min a 25 °C. Os poços foram lavados com água para remoção do cristal violeta não-aderido e, posteriormente, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado em etanol absoluto (15 min) e a absorbância a 570 nm foi mensurada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os biofilmes multiespécies e multicepas foram avaliados de acordo com o Stepanovic et al. (2007) e classificados em forte, moderado ou fraco.

Inibição de formação de biofilmes

Para avaliar a habilidade de CasuL em prevenir a formação dos biofilmes, utilizamos o protocolo de formação de biofilme anteriormente descrito. Inicialmente,

a solução da lectina, diluída em água Milli-Q estéril, foi preparada em diferentes concentrações e posteriormente filtradas a 0,20 μm . As soluções das lectinas (80 μL em água Milli-Q estéril) foram adicionadas no início da incubação juntamente com os inóculos bacterianos e meio de cultura. Na avaliação de sinergismo entre lectina e antibióticos comerciais (ceftazidima, cefoxitina e oxacilina), CasuL (na faixa de 6,25-200 $\mu\text{g/mL}$) e concentrações subinibitórias dos antibióticos (4 $\mu\text{g/mL}$) foram co-incubados (40 μL de CasuL + 40 μL do antibiotico) para posterior adição do inóculo bacteriano e meio de cultura. Para o controle do crescimento e formação do biofilme bacteriano, as células bacterianas foram incubadas com água Milli-Q estéril. Após 24 h a 35 °C, os poços foram lavados, fixados e corados com cristal violeta como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como redução do percentual da biomassa do biofilme comparado com o controle (células não tratadas).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em ensaios independentes em triplicata ou quadruplicata. Os dados foram expressos como a média ou a percentagem de média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o teste de Tukey; um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e discussão

Nos ensaios de verificação da capacidade de formação de biofilmes multicepas e multiespécies por diferentes combinações formadas por duplas de isolados de *Staphylococcus aureus* e/ou *Staphylococcus saprophyticus*, observou-se a formação de biofilme por vinte e uma combinações (Tabela 1). Dessas combinações, vinte se mostraram forte formadoras de biofilmes e apenas uma combinação se mostrou fraca formadora de biofilme. Sendo assim, CasuL foi testada frente às vinte combinações, isoladamente e em conjunto com os antibióticos oxacilina, cefoxitina e ceftazidima, comumente utilizados na clínica em infecções por causadas por esse gênero de bactéria.

Quando isolada, CasuL não foi capaz de inibir a formação de biofilme por nenhuma das vinte combinações, diferentemente dos resultados obtidos

anteriormente avaliando biofilmes monoespécie, quando ela foi capaz de inibir de forma significativa biofilmes de *S. aureus* e *S. saprophyticus* (PROCÓPIO et al., 2017). Efeito antibiofilme também não foi detectada para os antibióticos ceftazidima, cefoxitina e oxacilina (todos na concentração de 8 µg/mL) quando testados isoladamente. A complexidade de biofilmes multiespécies, através das suas interações a nível de metabolismo e mecanismo *quorum-sensing*, torna sua resistência às terapias antimicrobianas maior que em comparação com infecções por biofilmes monoespécies (KIM et al., 2021).

Tabela 1: Combinações e classificação de biofilmes formados por *S. aureus* e *S. saprophyticus* em meio Mueller-Hinton.

Combinações de Estirpes bacterianas	Classificação do biofilme
<i>S. aureus</i> 02 + <i>S. aureus</i> 670	Forte
<i>S. aureus</i> 02 + <i>S. aureus</i> 671	Forte
<i>S. aureus</i> 02 + <i>S. aureus</i> 672	Forte
<i>S. aureus</i> 02 + <i>S. aureus</i> (MRSA)	Forte
<i>S. aureus</i> 02 + <i>S. aureus</i> 8325-4	Forte
<i>S. aureus</i> 02 + <i>S. saprophyticus</i>	Forte
<i>S. aureus</i> 670 + <i>S. aureus</i> 671	Forte
<i>S. aureus</i> 670 + <i>S. aureus</i> 672	Forte
<i>S. aureus</i> 670 + <i>S. aureus</i> (MRSA)	Forte
<i>S. aureus</i> 670 + <i>S. aureus</i> 8325-4	Forte
<i>S. aureus</i> 670 + <i>S. saprophyticus</i>	Forte
<i>S. aureus</i> 671 + <i>S. aureus</i> 672	Forte
<i>S. aureus</i> 671 + <i>S. aureus</i> (MRSA)	Forte
<i>S. aureus</i> 671 + <i>S. aureus</i> (8325-4)	Forte
<i>S. aureus</i> 671 + <i>S. saprophyticus</i>	Forte
<i>S. aureus</i> 672 + <i>S. aureus</i> (MRSA)	Forte
<i>S. aureus</i> 672 + <i>S. aureus</i> 8325-4	Forte
<i>S. aureus</i> 672 + <i>S. saprophyticus</i>	Forte
<i>S. aureus</i> (MRSA) + <i>S. aureus</i> 8325-4	Forte
<i>S. aureus</i> 8325-4 + <i>S. saprophyticus</i>	Forte
<i>S. aureus</i> (MRSA) + <i>S. saprophyticus</i>	Fraco

As misturas CasuL + cefoxitina e CasuL + oxacilina também não apresentaram ação antibiofilme. Contudo, a mistura CasuL + ceftazidima foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a formação de biofilme pela combinação de *S. aureus* 670 + *S. aureus* MRSA (Figura 1), com redução em mais de 65% em todas concentrações testadas. CasuL + ceftazidima também inibiram a formação do biofilme multicepa *S. aureus* 670 + *S. aureus* 8325-4 (Figura 2) em mais de 80% em todas as concentrações testadas. Esses resultados demonstram um interessante potencial sinérgico entre a CasuL e a ceftazidima, uma vez que isoladamente essas moléculas não foram capazes de inibir a formação dos biofilmes multicepas de *S.*

aureus. Lyu et al. (2021) demonstraram que o Ácido Ursólico, composto natural derivado de muitas plantas (bagas, folhas de alfeneiro, folhas de paulownia, azevinho de ferro, entre outras), em uma baixa concentração (7.8 µg/mL) foi capaz de reduzir significativamente a biomassa e a atividade metabólica tanto do biofilme monoespécie quanto do biofilme multiespécie formado pelas bactérias patogênicas da microbiota oral *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii*.

Figura 1: Inibição de formação de biofilmes multicepa de *S. aureus* 670 + MRSA por CasuL e ceftazidima isoladamente e em combinação.

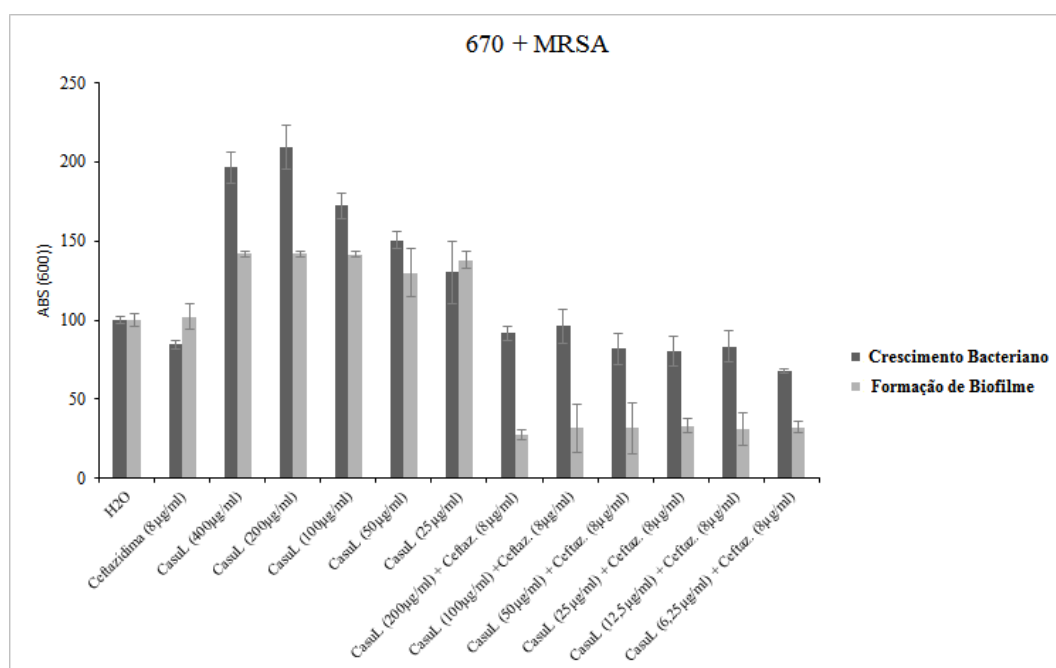
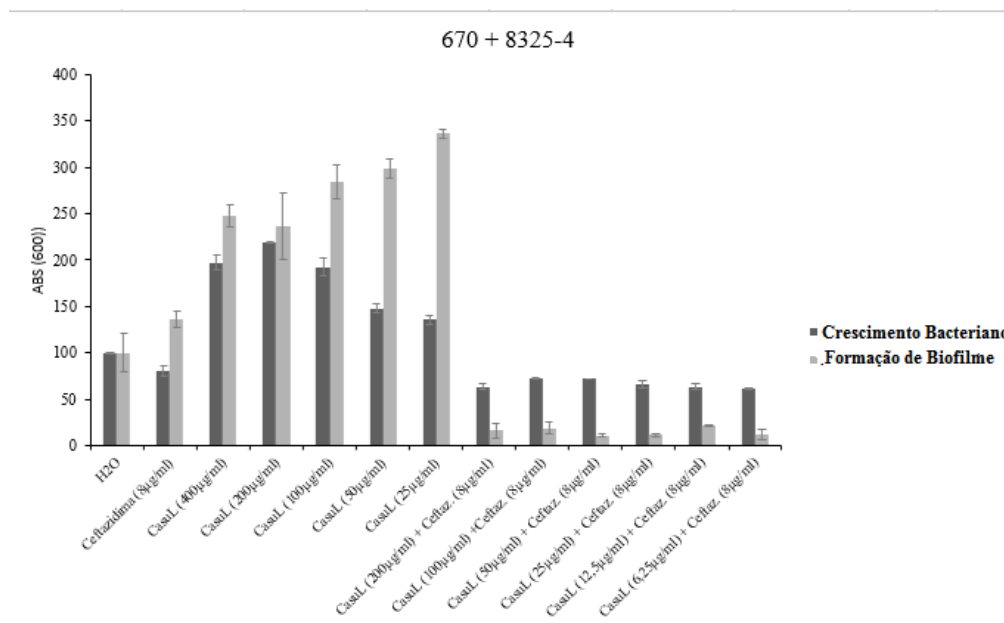


Figura 2: Inibição de formação de biofilmes multicepa de *S. aureus* 670+ 8325-4 por CasuL e ceftazidima isoladamente e em combinação.



A ação sinérgica entre CasuL (concentração) e antibióticos já foi descrita anteriormente. Essa lectina também foi capaz de inibir o crescimento de isolados de mastite bovina (Ss6PD e Sa) e caprina (Ss5D e Ssp01) do gênero *Staphylococcus*, bem como foi observado efeito sinérgico nas combinações CasuL-ampicilina contra Ssp01 e CasuL-tetraciclina contra Sa e Ssp6D; CasuL também foi capaz de reduzir a formação de biofilme pelos isolados Sa e Ss5D e, quando em combinação com tetraciclina e ampicilina, foi capaz de inibir a formação de biofilme por Ss6PD 2 Ssp01, respectivamente (PROCÓPIO et al., 2019).

Conclusão

CasuL, isoladamente, não foi capaz de inibir a formação dos biofilmes multicepas e multiespécies avaliados, porém quando em conjunto com o antibiótico ceftazidima, promoveu significativa inibição em duas combinações multicepas de *S. aureus*. Esse potencial sinérgico sugere a realização de estudos para elucidar melhor os mecanismos de sinergismo e de ação desses produtos frente a biofilmes multicepas de *S. aureus*.

Referências

Busscher, H.J.; Van Der Mei, H.C.; Subbiahdoss, G.; Jutte, P.C.; Van Den Dungen,

- J.J.; Zaat, S.A.; Schultz, M.J.; Grainger, D.W. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. **Science translational medicine**, v. 4, p. 1-11, 2012.
- Dias, R.O.; Machado, L.S.; Migliolo, L.; Franco, O.L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519–541, 2015.
- Fletcher, M.H.; Jennings, M.C.; Wuest, W.M. Draining the moat: disrupting bacterial biofilms with natural products. **Tetrahedron**, v. 70, p. 6373–6383, 2014.
- Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C.M.; Jouenne, T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1670–1684, 2012.
- Hooper, S.; Percival, S.L.; Williams, D. Biofilms and implication in medical devices in humans and animals. *Biofilms in Veterinary Medicine*, Springer Press, Biofilm Series, 2011.
- Kim, U., Kim, J. H., & Oh, S. W. Review of multi-species biofilm formation from foodborne pathogens: multi-species biofilms and removal methodology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v 1, p.11, 2021.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265–275, 1951.
- Lyu, X., Wang, L., Shui, Y., Jiang, Q., Chen, L., Yang, W., & Li, Y. Ursolic acid inhibits multi-species biofilms developed by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Streptococcus gordonii*. **Archives of Oral Biology**, v.125, p. 105107, 2021.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- Olivotto, E., Borzi, R.M., Vitellozzi, R., Pagani, S., Facchini, A., Battistelli, M., Penzo, M., Xiang, L., Flamigni, F., Jun, L. Falcieri, E.; Facchini, A.; Marcu, K.B. Differential requirements for IKK α and IKK β in the terminal differentiation of primary human osteoarthritic chondrocytes. **Arthritis & Rheumatology**, v. 58, p. 227–239, 2008.
- Percival, S.L.; Hill, K.E.; Williams, D.W.; Hooper, S.J.; Thomas, D.W.; Costerton, J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, v. 20, p. 647-657, 2012.
- Procópio, T.F.; Patriota, L.L.S.; Moura, M.C.; Silva, P.M.; Oliveira, A.P.S.; Carvalho,

- L.V.N.; Lima, T.A.; Soares, T.; Silva, T.D.; Coelho, L.C.B.B.; Pitta, M.G.R.; Rêgo, M.J.B.M.; Figueiredo, R.C.B.Q.; Paiva, P.M.G.; Napoleão, T.H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.
- Procópio, T. F., Moura, M. C., Bento, E. F., Soares, T., Coelho, L. C., Bezerra, R. P., & Napoleão, T. H. Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **MicrobiologyOpen**, v.8, n.11, p. e869, 2019.
- Trentin, D.S.; Silva, D.B.; Frasson, A.P.; Rzhepishevskaya, O.; Silva, M.V.; Pulcini, E.L.; James, G.; Soares, G.V.; Tasca, T.; Ramstedt, M.; Giordani, R.B.; Lopes, N.P.; Macedo, A.J. Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.
- Usha, H.L., Kaiwar, A., Mehta, D. Biofilms in endodontic infections: new understanding to an old problem. *International Journal of Contemporary Dentistry*, v. 1, p. 44-51, 2010.
- Vasconcelos, M.A.; Arruda, F.V.S.; Carneiro, V.A.; Silva, H.C.; Nascimento, K.S.; Sampaio, A.H.; Cavada, B.; Teixeira, E.H.; Henriques, M.; Pereira, M.O. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **Biomedical Research International**, v. 2014, p. 365272, 2014.
- Xu, Q.; Barrios, C.A.; Cutright, T.; Newby, N-M.Z. Assessment of antifouling effectiveness of two natural product antifoulants by attachment study with freshwater bacteria. **Environmental Science & Pollution Research**, v. 12, p. 278–284. 2005.

4.3. ARTIGO 3

Avaliação de atividades antifúngica e antibiofilme de lectinas da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) e folíolos de *Calliandra surinamensis* (CasuL) frente a linhagem de *Cryptococcus neoformans* (B3501)

Gustavo Ramos Salles Ferreira¹, Pollyanna Michelle da Silva¹, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Maiara Celine de Moura¹, Marilene Henning Vainstein², William Lopes², Ana Paula Sampaio Feitosa³, Fábio André Brayner³, Luiz Carlos Alves³, Thiago Henrique Napoleão ¹.

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Resumo

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada que possui como determinantes de virulência uma cápsula polissacarídica e a formação de biofilme, entre outros. A espécie é causadora da criptococose, doença distribuída mundialmente. Indivíduos imunocomprometidos são o principal grupo acometido pela criptococose, sendo essa a principal causadora de meningoencefalite. Atualmente a principal abordagem terapêutica para o tratamento da criptococose é feita através da combinação de fármacos antifúngicos, porém os crescentes níveis de resistência à tratamentos antimicrobianos, bem como seus custos, instigam a necessidade de novas alternativas. As lectinas CasuL e PgTeL, isoladas de *Calliandra surinamensis* e *Punica granatum*, respectivamente, possuem diversas atividades biológicas relatadas, incluindo antifúngica e antibiofilme. Sendo assim, investigamos possíveis atividades fungistática e fungicida de CasuL e PgTeL frente a *C. Neoformans* (B3501) bem como a capacidade das lectinas de inibirem a formação da cápsula polissacarídica e afetarem biofilmes formados pela linhagem de *C.*

neoformans. CasuL não apresentou atividade fungistática nem fungicida, nem foi capaz de inibir a formação ou erradicar biofilmes. Já PgTeL apresentou atividade fungistática contra a cepa B3501 de *C. neoformans* (sorotipo D), com uma concentração mínima inibitória de 172 µg/mL. PgTeL também foi capaz de inibir a formação de biofilme por B3501, reduzindo significativamente a biomassa e a atividade metabólica, além de erradicar biofilmes pré-formados. PgTeL, contudo, não foi capaz de alterar o tamanho de cápsulas formadas por B3501. A ação fungistática e antibiofilme de PgTeL sobre B3501 também foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstram que a lectina de *P. granatum* é uma potencial candidata a novo agente anticriptocócico, abrindo portas para estudos mais aprofundados em seu mecanismo de ação e possíveis estratégias de aplicação.

Introdução

A espécie *Cryptococcus neoformans* consiste em levedura encapsulada responsável pela criptococose, doença oportunista sistêmica que atinge principalmente pacientes imunocomprometidos e afeta mais comumente os pulmões. Em casos mais graves pode evoluir para uma meningite ou meningoencefalite. A patogênese dessa doença está diretamente associada a diversos fatores de virulência, tais como tolerância térmica, presença de cápsula, produção de melanina e capacidade de formação de biofilme (GIBSON & JOHNSTON, 2015; CORDEIRO et al., 2016). O tratamento para criptococose humana atualmente consiste na utilização de antifúngicos com elevada toxicidade (anfotericina B), baixa eficácia (equinocandinas) ou com alto índice de desenvolvimento de resistência (azóis). Dessa forma, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (KRYSAN, 2015).

Lectinas são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos, sendo amplamente encontradas na natureza. Nas plantas, essas proteínas têm sido descritas em folhas, entrecascas, raízes, rizomas, bulbos, vagens, sementes, frutos e flores. A ligação dessas proteínas a glicoconjugados presentes em superfícies celulares resulta em uma gama de propriedades biológicas (DIAS et al., 2015; PROCÓPIO et al., 2017a). As lectinas podem se ligar a proteínas de membrana ou intracelulares e gerarem diferentes tipos de respostas, as quais podem resultar em prejuízo ou melhora das funções celulares. A atividade antimicrobiana de lectinas

tem sido descrita e sugere-se que a ligação da lectina a glicoconjugados e polissacarídeos da superfície celular bacteriana ou fúngica inibe o crescimento e prejudica o desenvolvimento do microrganismo (COELHO et al., 2018). A atividade antifúngica das lectinas tem sido relacionada à capacidade de interação com componentes da parede celular fúngica (mananas, glucanas, quitina e/ou celulose), levando à inibição do crescimento, redução da absorção de nutrientes, alteração na germinação de esporos e morte celular (LAM & NG, 2010; CHIKALOVETS et al., 2015; YAN et al., 2015).

Os folíolos de *Calliandra surinamensis* (planta ornamental conhecida como “esponjinha rosa” ou “espanador de índio”) contêm uma lectina (denominada CasuL, do inglês *C. surinamensis* lectin), que apresentou efeitos bacteriostático e antibiofilme frente a *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (cepa padrão e resistente à oxacilina) bem como efeito antifúngico frente a *Candida krusei*, causando alterações morfológicas na estrutura celular bem como danos à parede celular (PROCÓPIO et al., 2017b). Já a lectina isolada da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) foi capaz de inibir o crescimento e promover a morte de *Candida albicans* e *Candida krusei*, induzindo peroxidação lipídica, colapso energético e danos à parede celular. PgTeL também inibiu a formação de biofilme por *C. albicans* (SILVA et al., 2016, 2018).

O presente trabalho investigou a possível atividade antifúngica das lectinas CasuL e PgTeL frente a linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* bem como a atividade antibiofilme das lectinas frente a *C. neoformans*.

Metodologia

Isolamento de CasuL e PgTeL

CasuL e PgTeL foram isoladas através dos procedimentos estabelecidos por Procópio et al. (2017) e Silva et al. (2016), respectivamente. Para isolamento de CasuL, folhas de *C. surinamensis* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, com autorização (nº 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O acesso foi registrado (AAD9107) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Em seguida, os folíolos foram destacados e pulverizados em

um multiprocessador. O pó foi suspenso em NaCl 0,15 M (10%, p/v) e homogeneizado durante 16 h usando um agitador magnético. A seguir, a suspensão foi filtrada em gaze e centrifugada (12.000 g, 15 min, 4 °C) para obtenção do extrato bruto. O extrato foi tratado com sulfato de amônio a 60% de saturação conforme descrito por Green e Hughes (1955), durante 4 h sob agitação magnética. Depois desse período, o material foi centrifugado (3000 g, 15 min) e a fração precipitada (FP) foi coletada (3,0 mg de proteína) e aplicada em uma coluna (30 x 1 cm) de Sephadex G-75 equilibrada com NaCl 0,15 M. Após a aplicação da amostra, a lectina foi eluída com NaCl 0,15 M. A eluição de CasuL foi monitorada medindo a absorbância a 280 nm.

Para isolamento de PgTeL, frutos de *Punica granatum* foram coletados em Glória do Goitá (Pernambuco, Brazil), com autorização (nº 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O acesso também foi registrado (A9F23D0) no SisGen. A sarcotesta foi separada das sementes através da passagem do material gelatinoso por uma peneira. O extrato foi preparado misturando-se a sarcotesta (90 mL) com NaCl 0,15 M (10 mL) em agitador magnético (6 h a 4 °C), seguido de filtração em gaze e centrifugação (9000 g, 15 min). Após centrifugação, o extrato foi tratado com sulfato de amônio (30% de saturação). Após agitação (4 h a 4 °C), a mistura foi centrifugada (9.000 g, 15 min) e a fração sobrenadante (FS30%) foi coletada e dialisada contra água destilada (4h) e NaCl 0,15 M (1 h). Posteriormente, a FS30% foi aplicada em uma coluna (7,5 x 1,5 cm) de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. PgTeL foi eluída com ácido acético 1,0 M e dialisada contra água destilada (4 h) e NaCl 0,15 M (4 h) para eliminar completamente o eluente.

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry *et al* (1951), utilizando curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL). Para avaliar se as lectinas estavam com a capacidade ligadora de carboidratos funcionando, foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante (AH). Foi utilizada uma suspensão a 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho fixados com glutaraldeído (BING *et al.* 1967). Os eritrócitos foram coletados por meio de protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (processo 23076.033782/2015-70). No ensaio de AH, a amostra (50 µL) foi diluída serialmente (até 1:2048) em NaCl 0,15 M em microplacas de 96 poços. Em seguida, 50 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados a cada poço. Eritrócitos incubados com

NaCl 0,15 M foram usados como controle. Após 45 min, a AH foi registrada como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação. A AH específica correspondeu à razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL).

Isolados fúngicos

A B3501 (sorotipo D) de *C. neoformans*, obtida no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foi cultivada em meio de extrato de levedura-peptona e dextrose (YPD) (2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedura) a 30 °C em plataforma de agitação constante por 48 h. Ágar a 1,5% (p/v) foi adicionado ao meio YPD quando foi necessário o uso do meio sólido. Para realização dos experimentos, os fungos foram cultivados em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) por 48 horas a 30°C e, posteriormente, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) para a obtenção de suspensão equivalente a 10^6 ou 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima fungicida (CMF)

CasuL e PgTeL foram diluídas em meio Sabouraud-Dextrose em dez diluições sucessivas (até 1:2048) e uma alíquota (80 µL) de cada diluição foi colocada em poços de uma placa de microtitulação de 96 poços. A todos os poços foram adicionados 40 µL da suspensão fúngica (10^6 UFC/mL) e a placa foi incubada a 30 °C por 48 h. O ensaio foi realizado em triplicata. Após incubação, a densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) foi medida em espectrofotômetro. A CMI correspondeu à menor concentração da lectina capaz de promover diminuição da DO_{600} igual ou maior que 50% em relação à DO_{600} no poço controle (AMSTERDAM, 1996). Para determinação da CMF, uma alíquota de cada poço onde houve inibição do crescimento foi transferida para uma placa de Petri contendo meio Sabouraud-Dextrose agar e incubada por 48 h a 30 °C. A menor concentração em que não foi observado crescimento fungico correspondeu à CMF.

Ensaio de inibição da formação e erradicação de biofilmes fúngicos

Os fungos foram cultivados em meio YPD por 24 h a 30 °C sob agitação. As células foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 3 min, lavadas três vezes com PBS, suspensas em meio mínimo (20 mg/mL de tiamina; 30 mM de glicose; 26 mM de glicina; 20 mM de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e 58.8 mM KH_2PO_4) e ajustadas para uma densidade de 10^7 células/mL. Os ensaios foram realizados em quadruplicata na presença ou ausência de CasuL ou PgTeL (em concentrações na faixa de 1 a 256 $\mu\text{g/mL}$), em placas de poliestireno de 96 poços. Anfotericina B (2 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. No controle negativo, o poço continha apenas o meio. Após incubação a 37 °C durante 48 h, os poços foram lavados três vezes com PBS. A formação de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (2%, p/v) (adaptado de MARTINEZ et al., 2006) e a atividade metabólica do biofilme foi quantificada utilizando o 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil amino) carbonila]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT) e menadiona (MESHULAM et al., 1995).

Para o ensaio de erradicação, suspensões celulares ajustadas para uma densidade de 10^8 células/mL (100 μL) de *C. neoformans* B3501 foram adicionadas em poços de placas de poliestireno de 96 poços. Após incubação a 30 °C por 48 h, os poços contendo biofilmes foram lavados três vezes com PBS para remover células criptocócicas não aderidas. As células fúngicas que permanecerem aderidas aos poços foram consideradas como biofilmes maduros. Para avaliar a suscetibilidade dos biofilmes, CasuL ou PgTeL (100 μL ; em concentrações na faixa de 1 a 1024 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada a cada poço. Anfotericina B (2 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como sistema de controle positivo. O controle negativo correspondeu a poço contendo apenas água e biofilmes não tratados. Os biofilmes maduros tratados ou não foram incubados a 37 °C por 48 h. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS e a atividade metabólica do biofilme quantificada usando o XTT. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Ensaio de indução de cápsula

Para a análise da formação de cápsula pela levedura, a cepa de *C. neoformans* B3501 foi cultivada em meio YPD por 24 h a 30 °C sob agitação. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 3.000 g durante 5 min, lavadas três vezes com PBS, suspensas em Meio Mínimo e ajustadas para uma densidade de

10^6 células/mL. Posteriormente, foram adicionados 250 μ L desse inóculo juntamente com 250 μ L da lectina em concentrações de 16 ou 32 μ g/mL em uma microplaca de 24 poços. Para o controle foi utilizado 250 μ L de Meio Mínimo no lugar das lectinas. As placas foram incubadas a 30 °C em estufa de CO₂ por 72 h para indução de formação de cápsula pela privação de nutrientes (Meio Mínimo) e alta concentração de CO₂. Após esse período, as células foram retiradas da placa, lavadas duas vezes com PBS (3 min a 5000 *rpm*) e fixadas com 5% de paraformaldeído durante 30 min. Em seguida, foram novamente lavadas com PBS e ressuspensas no próprio tampão e posteriormente colocadas em lâmina (6 μ L) juntamente com Nankim (4 μ L) e visualizadas em microscópio óptico (Zeiss Axioscop 40) para captura das imagens e posterior medição do tamanho relativo das cápsulas formadas. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a obtenção de imagens tridimensionais dos fungos na forma planctônica e dos biofilmes não-tratados e tratados com PgTeL na CMI, o material foi fixado em glutaraldeído 2,5% (v/v), lavado em tampão cacodilato (100 mM, pH 7,2) e desidratado em concentrações crescentes de acetona. Posteriormente, foram secos pela técnica de ponto crítico do CO₂, fixadas sobre um stub de alumínio com uma fita dupla face de carbono, cobertas com um filme de ouro e examinado no microscópio eletrônico de varredura Quanta 200F (FEI Company, Hillsboro, OR, USA).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em ensaios independentes em triplicata ou quadruplicata. Os dados foram expressos como a média ou a percentagem de média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o teste de Tukey; um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e discussão

CasuL não foi capaz de inibir o crescimento das linhagens de *Cryptococcus*

avaliadas. Por outro lado, PgTeL foi capaz de inibir o crescimento da cepa B3501 (sorotipo D) de *C. neoformans*, com uma CMI de 172 µg/mL (6,62 µM), porém sem apresentar efeito fungicida. Nem CasuL nem PgTeL demonstraram capacidade fungistática ou fungicida frente à linhagem de *C. gattii*. Poucas pesquisas relatam a ação de lectinas contra cepas de *C. neoformans*, porém a lectina scytovirina, extraída da cianobactéria *Scytonema varium*, inibiu o crescimento da cepa B3501 (sorotipo D) em mais de 50% na concentração de 20 µM; contudo, ao contrário de PgTeL, a scytovirina também apresentou ação fungicida contra essa linhagem e outros isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* (JONES et al., 2017).

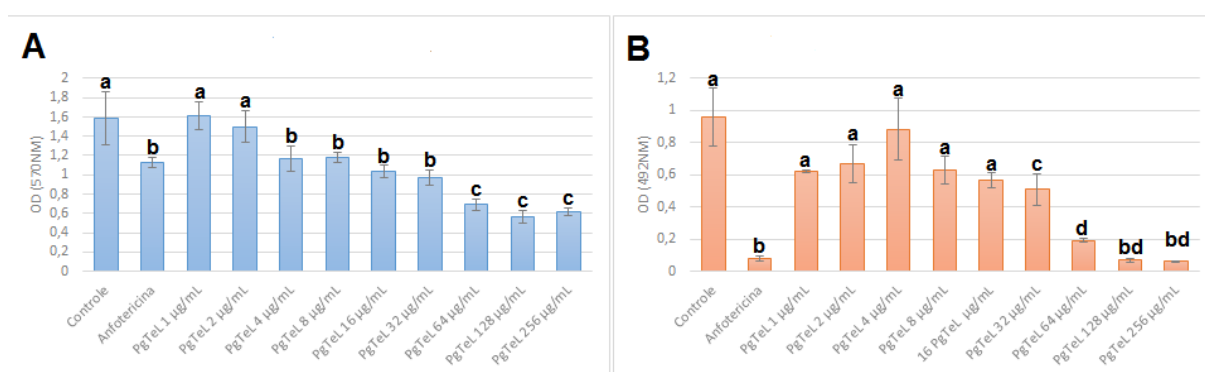
A capacidade das lectinas de interação com componentes da parede celular fúngica (mananas, glucanas, quitina e/ou celulose) pode estar diretamente ligada a sua atividade antifúngica, devido à inibição da multiplicação das células fúngicas, diminuição da capacidade de absorver nutrientes, alteração na germinação de esporos e consequente morte celular (LAM et al., 2010; CHIKALOVETS et al., 2015; YAN et al., 2015). PgTeL foi capaz de inibir o crescimento e promover a morte de *Candida albicans* e *Candida krusei* por induzir peroxidação lipídica, colapso energético e danos à parede celular (SILVA et al., 2018).

CasuL também não foi capaz de interferir na formação de biofilmes por *C. neoformans* B3501 (única linhagem formadora de biofilme entre as testadas), nem de erradicar biofilmes pré-formados. Já PgTeL (Figura 1A) foi capaz de reduzir, a partir da concentração de 4 µg/mL, a biomassa do biofilme em relação ao controle, valor semelhante ao obtido pelo antifúngico anfotericina B (2 µg/mL). Essa porcentagem de redução da biomassa foi aumentando gradativamente à medida que se aumentava a concentração de PgTeL, chegando a uma inibição de cerca de 64% em sua maior concentração (256 µg/mL). Em relação à atividade metabólica (Figura 1B) do biofilme, PgTeL foi capaz de causar uma redução de 34%, em relação ao controle, na concentração de 32 µg/mL e sendo, na sua maior concentração (256 µg/mL), capaz de inibir em 93% o metabolismo de células no biofilme da linhagem B3501 de *C. neoformans*.

A formação de biofilme consiste em um importante fator de virulência e está associada diretamente à maior resistência das células fúngicas, pois dificulta a penetração dos agentes antifúngicos na matriz extracelular, além de proteger contra o estresse ambiental e a ação do sistema imune do hospedeiro (SANTOS et al., 2015). Diversos estudos já relatam que tanto biofilmes com maior densidade de

biomassa e maior atividade metabólica apresentam elevada resistência contra agentes antifúngicos como os azóis e as equinocandinas (PERUMAL et al., 2007; RAMAGE et al., 2012; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2015). Biofilmes de *C. neoformans* já demonstraram maior resistência que as células plânctônicas à anfotericina B, ao fluconazol e ao voriconazol (DE MELO et al., 2020).

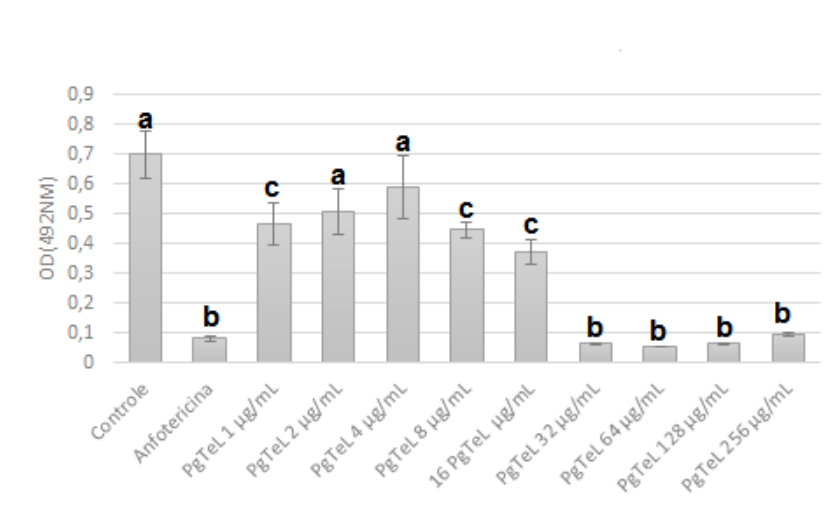
Figura 1: Ensaio de inibição de formação da biomassa de biofilme (A) e a atividade metabólica do biofilme (B) de *C. neoformans* B3501 frente a PgTeL. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.



Em relação a biofilmes pré-formados por *C. neoformans* B3501 (Figura 2), PgTeL demonstrou ser capaz de causar a erradicação de forma dose dependente: a partir da concentração de 8 µg/mL foi observada uma redução de 36% do biofilme em comparação com o controle, com essa porcentagem chegando a 92% na maior concentração (256 µg/mL). Esses resultados demonstram que PgTeL foi capaz de penetrar no biofilme e perturbar a sua organização.

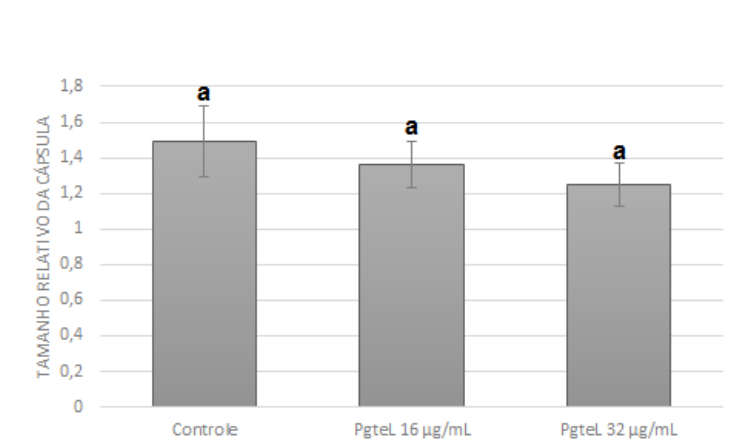
Os relatos de infecções associadas a biomateriais (tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses) por microorganismos formadores de biofilme têm sido cada vez mais comuns, sendo atualmente considerados um dos maiores problemas clínicos (BUHMANN et al., 2016). A erradicação de biofilmes, além de ser bastante difícil, geralmente requer concentrações de antimicrobianos que geralmente são tóxicas para o hospedeiro (DE MELO et al. 2020). Kumari et al. (2017) demonstraram capacidade de erradicação de biofilmes pré-formados de *C. neoformans* para três componentes de óleos essenciais do tomilho, alho e orégano (timol, eugenol e carvacrol, respectivamente), também com efeito dose dependente (concentrações entre 1 e 1024 µg/mL).

Figura 2: Ensaio de erradicação de biofilme de *C. neoformans* frente a PgTeL. A lectina apresentou uma significativa taxa de erradicação do biofilme comparado ou controle, sobretudo em suas maiores concentrações. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.



A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* desempenha um papel crucial na virulência e sobrevivência da levedura tanto no ambiente quanto em um hospedeiro. Ela atua na evasão da resposta imune e da fagocitose, extingue o fluxo de radicais livres do fagossoma, protege contra estresse oxidativo e ação de outros micro-organismos no meio ambiente e também está intimamente relacionada ao processo de formação de biofilme de *C. neoformans* (LEON-RODRIGUEZ et al., 2018; CASADEVALL et al., 2019). Em relação à formação da capsula, nas concentrações testadas, PgTeL não causou alterações significativas no tamanho e diâmetro das cápsulas formadas pela cepa B3501 (Figura 3).

Figura 3: Ensaio de redução do tamanho relativo da cápsula de *C. neoformans* frente a PgTeL. Não houve diferença estatística entre os ensaios com PgTeL e o controle. O tamanho relativo da cápsula corresponde a razão do tamanho do diâmetro da cápsula e o tamanho do diâmetro da célula.



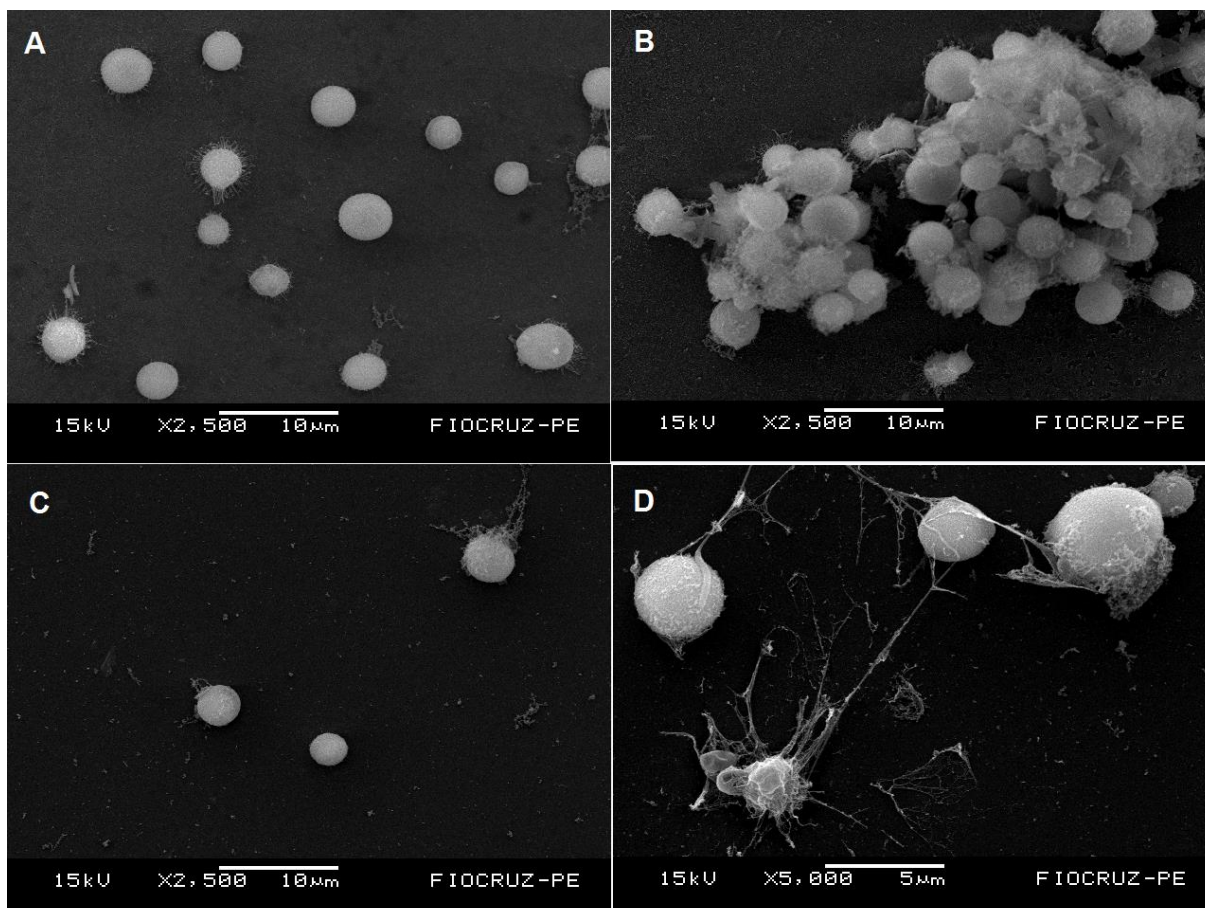
A análise das estruturas das células fúngicas pela microscopia eletrônica de varredura mostrou que PgTeL, na CMI, foi capaz de diminuir significativamente o número de células de *C. neoformans* B3501 (Figura 4C) em comparação com o controle (Figura 4A), porém sem causar nenhum dano estrutural evidente a essas células fúngicas, o que está de acordo com o efeito fungistático. Também pode-se observar que PgTeL foi capaz de reduzir significativamente a formação de matriz exopolimérica entre as células de *C. neoformans* (Figura 4D) em comparação com o controle (Figura 4B), corroborando assim com os resultados do teste de inibição da formação de biofilme. Martinez et al. (2010) demonstraram efeito da quitosana comercial (concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; e 5 mg/mL) tanto na diminuição significativa do número de células fúngicas, como também uma redução substancial na formação da matriz exopolimérica por *C. neoformans* B3501, efeitos também observados através da microscopia eletrônica de varredura. Os terpenos citral (64 µg/mL), carvacrol (32 µg/mL) e timol (16 µg/mL), também demonstraram ação contra biofilme de *C. neoformans* causando danos graves na estrutura das células e alterações morfológicas na superfície celular do biofilme, com formação de poros e consequente ruptura celular das células formadoras do biofilme visualizados na microscopia eletrônica de varredura (KUMARI et al., 2019).

Conclusão

CasuL não foi capaz de ter nenhuma ação fungistática, fungicida ou antibiofilme contra *C. neoformans*, enquanto PgTeL demonstrou uma ação

fungistática contra a linhagem B3501 (sorotipo D) de *C. neoformans*, além de reduzir significativamente tanto a biomassa do biofilme quanto sua atividade metabólica. PgTeL foi capaz ainda de promover erradicação de biofilme pré-formado por B3501. Os resultados demonstram que a lectina de *P. granatum* é uma potencial candidata a novo agente anticriptocócico, abrindo portas para estudos mais aprofundados em seu mecanismo de ação e possíveis estratégias de aplicação.

Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura de *C. neoformans* B3501 frente a PgTeL. Controle (A e B) e células tratadas com PgTeL em concentração de 172 µg/mL (C e D). Observa-se diminuição significativa do número de células planctônicas no tratamento com PgTeL (C) em comparação ao controle (A), bem como uma redução significativa na formação de matriz polimérica extracelular no biofilme tratado com PgTeL (D) em relação ao não tratado (B).



Referências

- Arendrup, M.C.; Cuenca-Estrella, M.; Lass-Flörl, C.; Hope, W.; Eucast-Afst. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18(7), p. E246-E247, 2012.
- Buhmann, M.T., Stiefel, P., Maniura-weber, K., Ren, Q. In vitro biofilm models for device-related infections. **Trends in Biotechnology**. v. 34, p. 945-948, 2016.
- Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R.J.B., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., Wear, M.P. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**. v. 10, n.1, p.822-

831, 2019.

- Chikalovets, I.V., Chernikov, O.V., Pivkin, M.V., Molchanova, V.I., Litovchenko, A.P., Li, W., Lukyanov, P.A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 42, p. 503-507, 2015.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M.S., De Oliveira, W.F., De Moura, M.C., Pontual, E.V., Gomes, F.S., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S. Lectins as antimicrobial agentes. **Journal of Applied Microbiology**. v. 125, n.5, p. 1238-1252, 2018.
- Cordeiro, R.A.; Evangelista, A.J.J.; Serpa, R.; Marques, F.J.F.; Melo, C.V.S.; Oliveira, J.S.; Franco, J.S.; Alencar, L.P.; Bandeira, T.J.P.G.; Brilhante, R.S.N.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162(2), p. 309-317, 2016.
- De Melo, T.R., Cordeiro, L.V., Souza, H.D.S., Athayde-Filho, P.F., Oliveira-Filho, A.A., Ferreira, S.B., Lima, E.O. Antifungal and antibiofilm activity of 2-Bromo-N-Phenylcetamide against *Cryptococcus neoformans*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 13, n.2, p. 173-176, 2020.
- Dias, R.O., Machado, L.S., Migliolo, L., Franco, O.L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**. v. 20, p. 519–541, 2015.
- Ferreira, G.R.S., Brito, J.S., Procopio, T.F., Santos, N.D.L., De Lima, B.J.R.C., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., Soares, T., De Moura, M.C., Napoleão, T.H. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**. v. 124, p. 152-162, 2018.
- Gaidamashvili, M.; Van Staden, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 131–135, 2002.
- Gibson, J.F.; Johnston, S.A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 76-86, 2015.
- Gomes, F.S.; Procópio, T.F.; Napoleão, T.H.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114(3), p. 672-679, 2013.

- Jones, T.H., McClelland, E.E., McFetters, H., McFetters, R.L. Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.755, 2017.
- Krysan, D.J. Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 93-98, 2015.
- Kumari, P., Arora, N., Chatrath, A., Gangwar, R., Pruthi, V., Poluri, K. M., & Prasad, R. Delineating the biofilm inhibition mechanisms of phenolic and aldehydic terpenes against *Cryptococcus neoformans*. **ACS omega**, v.4, n.18, p. 17634-17648, 2019.
- Lam, S.K.; Ng, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2010.
- Marcos-Zambrano, L.J., Escribano, P., Bouza, E., Guinea, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. **Medical Micology**. v.54, n.2, p.155-161, 2015.
- Meshulam, T.; Levitz, S.M.; Christin, L.; Diamond, R.D. A Simplified New Assay for Assessment of Fungal Cell Damage with the Tetrazolium Dye, (2,3)-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphenyl)-(2H)-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1153–1156, 1995.
- Mor, V.; Rella, A.; Farnoud, A.M.; Singh, A.; Munshi, M.; Bryan, A.; Nassem, S.; Konopka, J.B.; Ojima, I.; Bullesbach, E.; Ashbaugh, A.; Linke, M.J.; Cushion, M.; Collins, M.; Ananthula, H.K.; Sallans, L.; Desai, P.B.; Wiederhold, N.P.; Fothergill, A.W.; Kirkpatrick, W.R.; Patterson, T.; Wong, L.H.; Sinha, S.; Giaever, G.; Nislow, C.; Flaherty, P.; Pan, X.; Cesar, G.V.; Tavares, P.M.; Frases, S.; Miranda, K.; Rodrigues, M.L.; Liberto, C.; Nimrichter, L.; Del Poeta, M. Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. **mBio**, v. 6(3), p. e00647-15, 2015.
- Patriota, L.L.; Procópio, T.F.; Souza, M.F.D.; Oliveira, A.P.S.; Carvalho, L.V.N.; Pitta, M.G.R.; Rego, M.J.B.M.; Paiva, P.M.G.; Pontual, E.V.; Napoleão, T.H. A Trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 611, 2016.
- Perumal, P., Mekala, S., Chaffin, W.L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy. v. 51, n. 7, p. 2454-2463, 2007.

- Procópio, T.F.; Moura, M.M.; Albuquerque, L.P.; Gomes, F.S.; Santos, N.D.L.; Coelho, L.C.B.B.; Pontual, E.V.; Napoleão, T.H. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential, in: COLLINS, E. (Ed.), **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**, Nova Science Publishers Inc., New York, 2017a, pp. 69–89.
- Procópio, T.F.; Patriota, L.L.S.; Moura, M.C.; Da Silva, P.M.; Oliveira, A.P.S.; Carvalho, L.V.N.; Lima, T.A.; Soares, T.; Da Silva, T.D.; Coelho, L.C.B.B.; Pitta, M.G.R.; Rego, M.J.B.M.; Figueiredo, R.C.B.Q.; Paiva, P.M.G.; Napoleão, T.H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017b.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, 2012.
- Santos, A.F.S., Napoleão, T.H., Bezerra, R.F., Carvalho, E.V.M.M., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. In **Advances in Medicine and Biology** ed. Berhardt, L.V. 1st edn. v. 63, p. 33–60, 2013.
- Silva, P.M.; Moura, M.C.; Gomes, F.S.; Trentin, D.S.; De Oliveira, A.P.S.; De Mello, G.S.V.; Pitta, M.G.R.; Rego, M.J.B.M.; Coelho, L.C.B.B.; Macedo, A.J.; Figueiredo, R.C.B.Q.; Paiva, P.M.G.; Napoleão, T.H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.
- Silva, P.M.; Napoleão, T.H.; Silva, L.C.; Fortes, D.T.; Lima, T.A.; Zingali, R. B.; Pontual, E.V.; Araújo, J.M.; Medeiros, P.L.; Rodrigues, C.G.; Gomes, F.S.; Paiva, P.M.G. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.
- Yan, J.; Yuan, S. S.; Jiang, L. L.; Ye, X. J.; Ng, T. B.; Wu, Z. J. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99 (12), p. 4961-4981, 2015.

5 CONCLUSÕES

- A lectina CasuL em sinergismo com o antibiótico ceftazidima foi capaz de inibir a formação de biofilme multicepas de *Staphylococcus aureus*.
- A lectina PgTeL foi capaz de demonstrar um efeito fungistático contra a linhagem B3501 (sorotipo D) de *Cryptococcus neoformans*, apresentando ainda efeito inibitório na formação de biofilme e sendo capaz de erradicar biofilmes já formados, com redução da biomassa e da atividade metabólica.
- As lectinas são candidatas a novos agentes antibiofilme contra *S. aureus* e anticriptocócico, abrindo portas para estudos mais aprofundados em seu mecanismo de ação e possíveis estratégias de aplicação.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Apresentação do trabalho intitulado “Investigation of the Antifungal and Antibiofilm Activities of *Alpinia purpurata* Lectin (ApuL) against *Candida* Species” na XIV Reunião Regional da SBBq. (22 a 25/11/18).
- Artigo intitulado “Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. “ *South African Journal of Botany*, 129, 198-205. Coriolano, M. C., Brito, J. S., Ferreira, G. R. S., Moura, M. C., Melo, C. M. L., Soares, A. K. A., ... & Coelho, L. C. B. B. (2019). Link: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.014>
- Artigo intitulado “Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates.” *Journal of Applied Microbiology*, 130(3), 745-754. Moura, M. C., Procópio, T. F., Ferreira, G. R. S., Alves, R. R. V., Sá, R. A., Paiva, P. M. G., ... & Napoleão, T. H. (2020). Link: <https://doi.org/10.1111/jam.14811>
- Artigo intitulado “Antibacterial effects of the lectin from pomegranate sarcotesta (PgTeL) against *Listeria monocytogenes*.” *Journal of Applied Microbiology*. Silva, P. M., Silva, J. N. O., Silva, B. R., Ferreira, G. R. S., Gaião, W. D. C., Recio, M. V., ... & Paiva, P. M. G. (2020). Link: <https://doi.org/10.1111/jam.14978>
- Trabalho Intitulado “Antibacterial Acitivity of *Moringa oleifera* Seed Extracts”, publicado no periodico *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management (BIOFARM)* (ISSN: 1983-4209).

REFERÊNCIAS

- Abdel-Aziz, S., Aeron, A. Bacterial biofilm: dispersal and inhibition strategies, **Scholarena Journal of Biotechnoly.** v.1, p.105, 2014.
- Aguilar, A.P., Onofre, T.S., Fabres-Klein, M.H., Klein, R.C., Feio, R.N., de Oliveira Mendes, T.A., Ribon, A.D.O.B. Carbohydrate-independent antibiofilm effect of *Bothrops jacarassu* Lectin BJcuL on *Staphylococcus aureus*. v. 137, p. 103745, 2019.
- Akbapour, V., Hemmati, K., Sharifani, M. Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L), fruit in maturation stage. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences.** v.6, n.4, p. 411-416, 2009.
- Alves, R. R., Soares, T., Bento, E. F., Roldan-Filho, R. S., Souza, B. S., Lima, M. K., Paiva, P. M. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science.** V.76, n.2, p. 730-736, 2020.
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., Prevost, G. Coagulase-Negative *Staphylococci* Pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 20, n.5, p. 1215, 2019.
- Azeredo, J.; Azevedo, N.F.; Briandet, R., Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A.R.; Desvaux, M.; Di Bonaventura, G.; Hebraud, M.; Jaglic, Z.; Kacaniova, M.; Knøchel, S.; Lourenço, A.; Mergulhão, F.; Meyer, R.L.; Nychas, G.; Simões, M.; Tresse, O.; Sternberg, C. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology,** v. 43, n.3, p. 313-351, 2017.
- Bahar, A.A., Ren, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel).** v. 39, n.5, p. 1527-1532, 2013.
- Bazargani, M.M., Rohloff, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Biofilms. **Food Control,** v.61, p. 156-164, 2016.
- Bermas, A., Geddes-Mcalister, J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology.** v. 114, n.5, p. 721-734, 2020.
- Bhutia, S. K., Panda, P. K., Sinha, N., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., Panigrahi, D. P., Maiti, T. K. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological research.** v.144, p.8-18, 2019.

Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrene, Y.F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M., Rumbaugh, K.P., Schulte, T., Sun, L., Akerlund, B., Romling, U. Biofilm formation – what we can learn from recente developments. **Journal of International Medicine**. v. 284, p. 332-345, 2018.

Brito, J.S., Ferreira, G.R.S., Klimczak, E., Gryshuk, L., Santos, N.D.L., Patriota, L.L.S., Moreira, L.R., Soares, A.K.A., Barboza, B.R., Paiva, P.M.G., Navarro, D.M.A.F., De Lorena, V.M.B., De Melo, C.M.L., Coriolano, M.C., Napoleão, T.H. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 94, p. 865-872, 2017.

Buhmann, M.T., Stiefel, P., Maniura-weber, K., Ren, Q. In vitro biofilm models for device-related infections. **Trends in Biotechnology**. v. 34, p. 945-948, 2016.

Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C., Subbiahdoss, G., Jutte, P.C., Van Den Dungen, J.J., Zaat, S.A., Schultz, M.J., Grainger, D.W. Biomaterialassociated infection: locating the finish line in the race for the surface. **Science translational medicine**. v. 4, p. 1-11, 2012.

Carneiro, R.F., De Lima Jr, P.H.P., Chaves, R.P., Pereira, R., Pereira, A.L., De Vasconcelos, M.A., Pinheiro, U., Teixeira, E.H., Nagano, C.S., Sampaio, A.H. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017.

Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R.J.B., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., Wear, M.P. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**. v. 10, n.1, p.822-831, 2019.

Ch'ng, J.H., Chong, K.K.L., Lam, L.N., Wong, J.J., Kline, K.A. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**. v. 17, n.2, p. 82-94, 2019.

Chen, C.S., Chen, C.Y., Ravinath, D.M., Bungahot, A., Cheng, C.P., You, R.I. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC plant biology**. v. 18, n.1, p.1-11, 2018.

Chikalovets, I.V., Chernikov, O.V., Pivkin, M.V., Molchanova, V.I., Litovchenko, A.P., Li, W., Lukyanov, P.A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 42, p. 503-507, 2015.

Chung, P.Y., Toh, Y.S. Anti-biofilm agents: recente breakthrough against multi-drug

resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and disease**. v. 70, n.3, p. 231-239, 2014.

Coelho, L.C.B.B., Silva, M.S., De Oliveira, W.F., De Moura, M.C., Pontual, E.V., Gomes, F.S., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S. Lectins as antimicrobial agentes. **Journal of Applied Microbiology**. v. 125, n.5, p. 1238-1252, 2018.

Correa, M.S., Schwambach, J., Mann, M.B., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigerana*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.86, 2019.

Da Silva, J. D. F., da Silva, S. P., da Silva, P. M., Vieira, A. M., de Araújo, L. C. C., de Albuquerque Lima, T., Paiva, P. M. G. Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**. v.126, p.291-297, 2019.

David, M.Z., Daum, R.S. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Currents Topics in Microbiology and Immunology**. v.409, 2017.

De Camargo, L. J., Picoli, T., Fischer, G., de Freitas, A. C. O., de Almeida, R. B., Da Silva Pinto, L. Antiviral activity of native banana lectin against bovine viral diarrhea virus and bovine alphaherpesvirus type 1. **International journal of biological macromolecules**. v.157,p.569-576, 2020.

De Melo, T.R., Cordeiro, L.V., Souza, H.D.S., Athayde-Filho, P.F., Oliveira-Filho, A.A., Ferreira, S.B., Lima, E.O. Antifungal and antibiofilm activity of 2-Bromo-N-Phenylcetamide against *Cryptococcus neoformans*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 13, n.2, p. 173-176, 2020.

De Oliveira, A. P. S., Agra-Neto, A. C., Pontual, E. V., de Albuquerque Lima, T., Cruz, K. C. V., de Melo, K. R., Paiva, P. M. G. Evaluation of the insecticidal activity of Moringa oleifera seed extract and lectin (WSMoL) against Sitophilus zeamais. **Journal of Stored Products Research**. v.87, p. 101615, 2020.

De Paiva Santos, W., De Souza, V.S., Giambiagi-deMarval, M. Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from diferente sources. **Microbial Pathogenesis**. v. 119, p. 9-11, 2018.

Delattin, N., Cammue, B., and Thevisse, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Medical Chemistry**. v.6, p. 77–90, 2014.

Dellatin, N., De Brucker, K., De Cremer, K., Cammue, B.P.A., Thevissen, K.

Antimicrobial Peptides as a strategy to combat fungal antibiofilms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.17, n.5, p. 604-612, 2017.

Di Martino, P., Merieau, A., Phillips, R., Orange, N., Hulen, C. Isolation of an *Escherichia coli* strain mutant unable to form biofilm on polystyrene and to adhere to human pneumocyte cells: involvement of tryptophanase. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 132–137, 2002.

Dias, R.O., Machado, L.S., Migliolo, L., Franco, O.L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**. v. 20, p. 519–541, 2015.

Dos Santos, A. J. C. A., da Silva Barros, B. R., de Souza Aguiar, L. M., de Siqueira Patriota, L. L., de Albuquerque Lima, T., Zingali, R. B., Pontual, E. V. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**. V. 10, n.4,p.1-9, 2020.

El-Maradny, Y. A., El-Fakharany, E. M., Abu-Serie, M. M., Hashish, M. H., Selim, H. S. Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2021.

Erhlers, S., Stefan, A.M. “*Staphylococcus saprophyticus*”. In: **StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)**, 2020.

Falodun, A., Uzoekwe, A.S., Shengxiang, Q. Phytochemical, Anticancer and Antioxidant Evaluation of Potential Chemical Constituents of *Calliandra surinamensis*. **Nigerian Journal of Biotechnology**. v. 21, p.55-59, 2010.

Ferreira, G.R.S., Brito, J.S., Procopio, T.F., Santos, N.D.L., De Lima, B.J.R.C., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., Soares, T., De Moura, M.C., Napoleão, T.H. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**. v. 124, p. 152-162, 2018.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S. Biofilms: an emergente form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. v.14, p. 563-575, 2016.

Fontenelle, T. P. C., Lima, G. C., Mesquita, J. X., de Souza Lopes, J. L., de Brito, T. V., Júnior, F. D. C. V., Freitas, A. L. P. Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International journal of biological macromolecules**. v.112, p.1122-1130, 2018.

- Foster, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**. v.41, n.3, p.430-449, 2017.
- Grebeyohannes, G.; Nyerere, A.; Bii, C.; Sbhatu, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**. v. 5, n.8, p. E02192, 2019.
- Gullon, B., Pintado, M.E., Perez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. **Food Control**. v.59, p.94-98, 2016.
- Hur, J., Lee, A., Hong, J., WY, J., OH, C., Kim, S., Bae, I.G. *Staphylococcus saprophyticus* bacteremia originating from Urinary Tract Infections: A case report and literature review. **Infect Chemotherapy**. v. 48, n.2, p. 136-139, 2016.
- Islam, B., Khan, S.N., Naeem, A., Sharma, V., Khan, A.U. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, p. 1682–1689, 2009.
- Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M.A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**. v.81, n.1, p.7-11, 2018.
- Jenul, C., Horswill, A.R. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. **Gram-positive Pathogens**. p. 669-686, 2019.
- Jolivet-Gougeon, A; Bonnaure-Mallet, M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance, **Drug Discovery Today: Technology**. v.11, p.49–56, 2014.
- Jones, T.H., McClelland, E.E., McFetters, H., McFetters, R.L. Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p.755, 2017.
- Joshi, R.V., Gunawan, C., Mann, R. We are one: Multispecies metabolism of a biofilm consortium and their treatment strategies. **Frontiers in Microbiology**. v.12, 2021.
- Kang, J., Jin, W., Wang, J., Sun, W., Wu, X., Liu, L. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*.
- King, N.P., Sakine, T., Ben Zakour, N.L., Totsika, M., Heras, B., Simerska, P. Characterisation of a cell wall-anchored protein of *Staphylococcus saprophyticus* associated with linoleic acid resistance. **BMC Microbiology**. v. 12, n.8, 2012.
- Klafke, G.B, Borsuk, S., Gonçalves, R.A., Arruda, F.V.S., Carneiro, V.A., Teixeira, E.H., Coelho Da Silva, A.L., Cavada, B.S., Dellagostin, O.A., Pinto, L.S. Inhibition of

initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. *variegata* expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 115, p. 1222–1230, 2013.

Kumari, P., Mishra, R., Arora, N., Chatrath, A., Gangwar, R., Roy, P., Prasad, R. Antifungal and anti-biofilm activity of Essential Oil active components against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus laurentii*. **Frontiers in Microbiology**. v.8, p. 2161, 2017.

Kumari, P., Mishra, R., Arora, N., Chatrath, A., Gangwar, R., Roy, P., Prasad, R. Antifungal and anti-biofilm activity of Essential Oil Components against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus laurentii*. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 2161, 2017.

Kvich, L., Burmølle, M., Bjarnsholt, T., Lichtenberg, M. Do mixed-species biofilms dominate in chronic infections?- Need for in situ visualization of bacterial organization. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.10, 2020.

Lahkundi, S., Zhang, K. Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Review**. v.31, n.4, 2018.

Lam, S.K., Ng, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2010.

Le, K.Y., Park, M.D., Otto, M. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p.359, 2018.

Lee, J.H., Kim, Y.G., Shim, S.H., Lee, J. Antibiofilm activities of norhamane and its derivatives against *Escherichia coli* O157:H7 and other bacteria. **Phytomedicine**. v. 36, p. 254-261, 2017.

Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., Li, M. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese Medicine**. v.14; 2019.

Lusvarghi, S., Bewley, C.A. Griffithsin: an antiviral lectin with outstanding therapeutic potential. **Viruses**. v.8, n.10, p.296, 2016.

Macedo, M.L.R.; Oliveira, C.F.R.; Oliveira, C.T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**. v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

Marcos-Zambrano, L.J., Escribano, P., Bouza, E., Guinea, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by

metabolic activity or biomass production. **Medical Micology**. v.54, n.2, p.155-161, 2015.

Martinez, L.R., Casadevall, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Spectrum**. v.3, p.1-11, 2015.

Martinez, L.R., Mihai, M.R., Han, G., Frases, S., Cordero, R.J.B., Casadevall, A., Friedman, A.J., Friedman, J.M., Nosanchuk, J.D. The use of Chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**. v.31, n.4, p. 669-679, 2010.

Mazalovska, M., Kouokam, J.C. Plant-derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **Biomed Research International**. 2020.

Mercola, B., What are pomegranates good for?. **Natural Health Newsletter**. 2015.

Mesquita, J. X., de Brito, T. V., Fontenelle, T. P. C., Damasceno, R. O. S., de Souza, M. H. L. P., de Souza Lopes, J. L., Freitas, A. L. P. Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.170, p.532-539, 2021.

Moormeier, D.E., Bayles, K.W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular microbiology**. v.104, n.3, p. 365-376, 2017.

Moura, M.C., Napoleão, T.H., Coriolano, M.C., Paiva, P.M.G., Figueiredo, R.C.B.Q., Coelho, L.C.B.B. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.

Moura, M.C., Trentin, D.S., Napoleão, T.H., Primon-barros, M., Xavier, A.S., Carneiro, N.P., Paiva, P.M.G., Macedo, A.J., Coelho, L.C.B.B. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm, and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**. v. 123, n. 4, p. 861-874, 2017.

Mourad, A., Perfect, J.R. Present and future therapy of *Cryptococcus* infections. **Journal of Fungi**. v.4, n.3, p.79, 2018.

Muller, S., Wolf, A.J., Iliev, I.D., Berg, B.L., Underhill, D.M., Liu, G.Y. Poorly cross-linked peptidoglycan in MRSA due to *mecA* induction activates the inflammasome and exacerbates immunopathology. **Cell host & Microbe**. v. 18, n.5, p. 604-612, 2015.

Natsis, N.E., Cohen, P.R. Coagulase-Negative *Staphylococcus* skin and soft tissue infections. **American Journal of Clinical Dermatology**. v. 19, n.5, p. 671-677,

2018.

Norsworthy, A.N., Pearson, M.M. From catheter to kidney stone: the uropathogenic lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Trends of in Microbiology**. v.25, n.4, p. 304-315, 2017.

Nunez-Sanchez, M.A., Davalos, A., Gonzalez-Sarrias, A., Casas-Agustench, P., Visioli, F., Monedero-Saiz, T., Garcia-Talavera, N.V., Gomez-Sanchez, M.B., et al. MicroRNAs expression in normal and malignant colon tissues as biomarkers of colorectal cancer and in response to pomegranate extracts consumption: critical issues to discern between modulatory effects and potential artefacts. **Molecular nutrition & food research**. v. 59, n.10, p. 1973-1986, 2015.

Oliveira, W.F., Silva, P.M.S., Silva, R.C.S., Silva, G.M.M., Machado, G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. **Journal of Hospital Infection**. v. 98, n.2 , p.111-117.

Omar, S.M., Ahmat, N., Nik Azmin, N.F., Sabandar, C.W., Muqarrabun, A., Ramadhan, L.M. Isolation and characterization of chemical constituents from the flower of *Calliandra surinamensis* Benth. **The Open Conference Proceedings Journal**. 2013.

Payne, D.E., Martin, N.R., Parzych, K.R., Rickard, A.H., Underwood, A., Boles, B.R. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. **Infection and Immunity**. v.81, n.2, p. 496-504, 2013.

Percival, S.L. Importance of biofilm formation in surgical infection. **British Journal of Surgery**. v.104, n.2, p. e85-e94, 2017.

Perfect, J.R., Dismukes, W.E., Dromer, F., Goldman, D.L., Graybill, J.R., Hamill, R.J. Guideline for cryptococcus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 291–322, 2018.

Perumal, P., Mekala, S., Chaffin, W.L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 7, p. 2454-2463, 2007.

Pinault, L., Chabiere, E., Raoult, D., Fenollar, F. Direct identification of pathogens in urine by use of a specific matrix-assisted laser desorption ionization-time off light spectrum database. **Journal of Clinical Microbiology**. v.57, n.4, 2019.

Pollit, E.J.G., Szukta, P.T., Burns, N., Foster, S.J. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. **PLoS Pathogens**. v. 14, n.6, p. e1007112, 2018.

Preetham, E., Lakshmi, S., Wongpanya, R., Vaseeharan, B., Arockiaraj, J., Olsen, R. E. Antibiofilm and immunological properties of lectin purified from shrimp *Penaeus semisulcatus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.106, p.776-782, 2020.

- Procopio, T.F., Moura, C.M., Bento, E.F.L., Soares, T., Coelho, L.C.B.B., Bezerra, R.P., Mota, R.A., Porto, A.L.F., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H. Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **MicrobiologyOpen**. v. 8, n.11, p. e869, 2019.
- Procópio, T.F., Patriota, L.L.S., Moura, M.C., Silva, P.M., Oliveira, A.P.S., Carvalho, L.V.N., Lima, T.A., Soares, T., Silva, T.D., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 98, p. 419-429, 2017.
- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., Denning, D.W., Loyse, A., Boulware, D.R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: An updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**. v.17, p. 873–881, 2017.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, 2012.
- Rendueles, O., Kaplan, J.B., Ghigo, J-M. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**. v. 15, p. 334–346, 2013.
- Rhodes, J., Beale, M.A., Vanhove, M., Jarvis, J.N., Kannambath, S., Simpson, J.A., et al. A population genomics approach to assessing the genetic basis of within-host microevolution underlying recurrent cryptococcal meningitis infection. **G3 Genes|Genomes|Genetics**. v.7, n.4, p.1165–1176, 2017.
- Romling, U., Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies, **J. Intern. Med**. v.272, p.541–561, 2012.
- Rubeena, A. S., Divya, M., Vaseeharan, B., Karthikeyan, S., Ringø, E., Preetham, E. Antimicrobial and biochemical characterization of a C-type lectin isolated from pearl spot (*Etroplus suratensis*). **Fish & shellfish immunology**. v.87,p. 202-211, 2019.
- Saha, R.K., Acharya, S., Jamiruddin, M., Roy, P., Islam, M.D.S., Shovon, S.S.H. Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. **The Journal of Phytopharmacology**. v. 3, p. 44-51, 2014.
- Salwe, K.J., Sachdev, D.O., Bahurupi, Y., Kumarappan, M. Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. **Journal of natural Science**,

biology, and medicine. v.6, n.1, p. 56, 2015.

Santiago-Tirado, F.H., Onken, M.D., Cooper, J.A., Klein, R.S., Doering, T.L. Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen.

MBio. v. 8, n.1, 2017.

Santos, A.F.S., Napoleão, T.H., Bezerra, R.F., Carvalho, E.V.M.M., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. In **Advances in Medicine and Biology** ed. Berhardt, L.V. 1st edn. v. 63, p. 33–60, 2013.

Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S. Review on bacterial biofilm: An universal causa of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** v.7, p.56-66, 2016.

Satthanakul, P., Taweechaisupapong, S., Paphangkorakit, J., Pesee, M., Timabut, P., Khunkiti, W. Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour microorganisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. **Journal of Applied Microbiology.** v.118, n.1, p. 11-17, 2015.

Shaygania, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., Rafieian-Kopaei, M. A review study on *Punica granatum* L. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine.** v. 21, n.3, p. 221-227, 2016.

Shi, S.F., Jia, J.F., Guo, X.K., Zhao, Y.P., Chen, D.S., Guo, Y.Y., Zhang, X.L. Reduced *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the presence of chitosan-coated iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine.** v. 11, p. 6499, 2016.

Siddiqi, A.H., Koirala, J. Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **StatPearls (Internet)**, 2019.

Sikder, M.A.A., Kaisar, M.A., Rashid, M.A., Millat, M.S., Sultana, A. In vitro membrane stabilizing activity, total phenolic content, cytotoxic, thrombolytic and antimicrobial activities of *Calliandra surinamensis* (Wall.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.** v. 1, n.3, p. 45-50, 2012.

Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Trentin, D.S. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical Review.** v. 116, p. 9162-9236, 2016.

Silva, P.M., Baldry, M., Peng, P., Silva, J.N.O., Soares, T., Brayner, F.A., Alves, L.C., Feitosa, A.P.S., Paiva, P.M.G., Ingmer, H., Napoleão, T.H. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impair growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International Journal of**

Biological Macromolecules. v.123, p.600-608, 2019a.

Silva, P.M., Da Silva, B.R., Silva, J.N.O., Moura, M.C., Soares, T., Feitosa, A.P.S., Brayner, F.A., Alves, L.C., Paiva, P.M.G., Damborg, P., Ingmer, H., Napoleão, T.H. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules.** v.135, p.931-939, 2019b.

Silva, P.M., Moura, M.C., Gomes, F.S., Trentin, D.S., De Oliveira, A.P.S., De Mello, G.S.V., Pitta, M.G.R., Rego, M.J.B.M., Coelho, L.C.B.B., Macedo, A.J., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 108, p. 391-400, 2018.

Silva, P.M., Napoleão, T.H., Silva, L.C., Fortes, D.T., Lima, T.A., ZINGali, R. B., Pontual, E.V., Araújo, J.M., Medeiros, P.L., Rodrigues, C.G., Gomes, F.S., Paiva, P.M.G. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods.** v. 27, p. 695-702, 2016.

Silva, P.M., Silva, J.N.O., Ferreira, G.R.S., Galão, W.D.C., Recio, M.V., Gonçalves, G.G.A., Rogrigues, C.G., Medeiros, P.L., Brayner, F.A., Alves, L.C., Larsen, M.H., Ingmer, H., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G. Antibacterial effects of the lectin from pomegranate sarcotesta (PgTeL) against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology.** 2020.

Singh, R., Sahore, S., Kaur, P., Rani, A., Ray, P. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-strain-and antibiotic-specific differences. **Pathogens and disease.** v. 74, n.6, 2016.

Sit, P.S., Teh, C.S.J., Idris, N., Sam, I., Omar, S.F.S., Sulaiman, H., Thong, K.L., Kamarulzaman, A., Ponnampalavanar, S. Prevalence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. **BMC Infectious Diseases.** v. 17, n.1, p. 1-14, 2017.

Slobodnikova, L., Fialova, S., Rendenkova, K., Kovac, J., Mucaji, P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules.** v.21, n.12, p.1717, 2016.

Smith, K.D., Achan, B., Hullsiek, K.H., McDonald, T.R., Okagaki, L.H., Alhadab, A.A., et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus*

- neoformans in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.59, n.12,p.7197–7204, 2015.
- Song, X., Xia, Y.Z., He, Z.D., Zhang, H.J. A review of natural products with anti-biofilm activity. **Current organic Chemistry**. v. 22, p. 788-816, 2018.
- Srichatrapimuk, S., Sungkanuparph, S. Integrated therapy for HIV and cryptococcosis. **AIDS Research and Therapy**. v.13, n.1, p. 42, 2016.
- Suresh, M.K., Biswas, R., Biswas, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 309, n.1, p.1-12, 2019.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Review**. v.25, n.3, p.603-661, 2015.
- Toyofuku, M.; Inaba, T.; Kiyokawa, T.; Obana, N.; Yawata, Y.; Nomura, N. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**. v. 80, n.1, p. 7-12, 2016.
- Trentin, D.S., Silva, D.B., Frasson, A.P., Rzhepishevskaya, O., Silva, M.V., Pulcini, E.L., James, G., Soares, G.V., Tasca, T., Ramstedt, M., Giordani, R.B., Lopes, N.P., Macedo, A.J. Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Scientific Reports**. v. 5, p. 1–10, 2015.
- Vasudevan, R. Biofilms: microbial cities in of scientific significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**. v.1, n.3, p.00014, 2014.
- Vriens, K., Cools, T. L., Harvey, P. J., Craik, D. J., De Coninck, B., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. The radish defensins RsAFP1 and RsAFP2 act synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Peptides**. v. 75, p. 71-79, 2016.
- Vriens, K., Cools, T. L., Harvey, P. J., Craik, D. J., De Coninck, B., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. Synergistic activity of the plant defensin HsAFP1 and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures. **PloS one**. v. 10, n. 8, p. e0132701, 2015.
- Walsh, C., Wencewicz, T. **Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities**. John Willey & Sons, 2020.
- Wang, Y., Zhang, Y., Shao, J., Wu, B., Li, B. Potential immunomodulatory activities of a lectin from the mushroom *Latiporus sulphureus*. **International journal of biological macromolecules**. v.130, p. 399-406, 2019.

Yan, J., Yuan, S. S., Jiang, L. L., Ye, X. J., Ng, T. B., Wu, Z. J. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99 (12), p. 4961-4981, 2015.

Zaragoza, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**. v. 10, n.1, p. 490-501, 2019.

Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T.L., Cano, R.J., Adams, S., Schuyler, J.A., McMillan, R., Pace, J.L. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.6, n.12, p.a026989, 2016.

Zhang, W., Bouwman, K.M., Beurden, S.J.V., Ordonez, S.R., Eijk, M.V., Haagsman, H.P., Verheije, M.H., Veldhuizen, E.J.A. Chicken mannose binding lectin has antiviral activity towards infectious bronchitis virus. **Virology**. v. 509, p. 252-259, 2017.

Kwon-Chung, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** v.4, a019760 2014.

Heitman J, Kozel T.R, Kwon-Chung K.J, et al. *Cryptococcus*. From human pathogen to model yeast. **Washington (DC): ASM Press**, 2011.

Loyse, A. et al. Leave no one behind: response to new evidence and guidelines for the management of cryptococcal meningitis in low-income and middle-income countries. **Lancet Infect. Dis**, v. 19, p. e143–e147, 2019.

Iyer, K. R., Revie, N. M., Fu, C., Robbins, N., & Cowen, L. E. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v.19, n.7, p. 454-466, 2021.