UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SIMEONE JÚLIO DOS SANTOS CASTELO BRANCO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANOS *IN VIVO* DA LECTINA DE *Punica granatum* (PgTeL) EM MODELO DE FERIDA INFECTADA POR *Staphylococcus aureus*

Recife

2021

SIMEONE JÚLIO DOS SANTOS CASTELO BRANCO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANOS *IN VIVO* DA LECTINA DE *Punica granatum* (PgTeL) EM MODELO DE FERIDA INFECTADA POR *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profª Drª. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Prof. Dr. Luís Claudio Nascimento da Silva

Recife

2021

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário:Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Castelo Branco, Simeone Júlio dos Santos.
Avaliação dos efeitos antibacterianos in vivo da Lectina *de Punica granatum* (PgTeL) em modelo de ferida infectada por *staphylococcus aureus*. / Simeone Júlio dos Santos Castelo Branco – 2023.

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

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva.
Coorientador: Luís Claudio Nascimento da Silva.

Mestrado (dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Camundongo. 2. Planta. 3. Proteína. 4. Staphylococcus aureus. I. Paiva,Patrícia Maria Guedes. (Orient.). II. Silva, Luís Claudio Nascimento da. (Coorient.). III.Título.

572 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2024-012

SIMEONE JÚLIO DOS SANTOS CASTELO BRANCO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANOS *IN VIVO* DA LECTINA DE *Punica granatum* (PgTeL) EM MODELO DE FERIDA INFECTADA POR *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 09/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Francis Soares Gomes (Examinador Externo)

Universidade Federal de Alagoas

_____

Dr. Rodrigo da Silva Ferreira (Examinador Externo)

Universidade Federal de São Paulo

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me dar direção e a oportunidade de chegar até aqui, e aos meus familiares por todo apoio e confiança nessa longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar todo o suporte, tanto físico quanto espiritual para vencer todos os obstáculos, por me dar direção nas minhas escolhas e atitudes, e por me conduzir até o fim dessa caminhada que foi o mestrado.

Aos meus pais e à toda minha família, que foram peças fundamentais nesse meu processo e por sempre estarem do meu lado em todos meus erros e acertos, por terem me incentivado e acreditado em todos os meus sonhos.

A minha orientadora, Prof. Dra. Patrícia Paiva, por toda a dedicação, por todos os ensinamentos e orientação. Sem o seu carinho pela pesquisa e todo seu esforço, nada disso seria possível.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luís Claúdio, por sempre ter acreditado em mim, por ter me proporcionado crescer tanto na pesquisa, e por ter aberto não só essas portas, mas também por ter me apresentado sua família, que hoje em dia eu posso dizer que são minha família pernambucana.

Aos alunos de iniciação cientifica da Universidade Ceuma, em especial Lucas e Izadora, por toda ajuda e por terem se tornado amigos que quero levar sempre no meu coração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, por todo o conhecimento adquirido, conhecimentos esses que me ajudaram bastante tanto na minha formação profissional, quanto pessoal.

A todos os meus colegas e grandes amigos pesquisadores do Laboratório de Bioquímica de Proteínas - BIOPROT, por terem sido de fundamental importância no desenvolvimento desse trabalho e por todo companheirismo em todos os momentos juntos.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de Mestrado.

E por fim, não menos importante, agradecer a mim por nunca ter desistido dos meus sonhos mesmo em momentos bem difíceis.

Sempre há algo a aprender e conceitos a reciclar. A mudança para melhor não implica em destruir o que fomos, mas dar nova direção e maior aproveitamento a tudo que conquistamos, inclusive nossos erros.

Ermance Dufaux

RESUMO

A lectina PgTeL isolada da sarcotesta de *Punica granatum* é uma proteína de 26 kDa que tem atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* contra patógenos humanos. A dissertação avaliou o efeito antibacteriano *in vivo* de PgTeL contra *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram positiva que é bastante encontrada no ambiente e na microbiota humana, que em muitos casos podem acarretar em sérios problemas de saúde. A lectina foi isolada de acordo com procedimento estabelecido anteriormente. No ensaio *in vivo* lesões (8mm) induzidas na região do dorso dos camundongos foram infectadas com *S. aureus* ATCC 6538 (0,5x 10 8 UFC/mL) e um dia após a infecção, as feridas foram tratadas diariamente por 10 dias com PgTeL (25 e 100 µg/mL). As lesões foram avaliadas entre 3 e 10 dias quanto a parâmetros inflamatórios e após o fim do tratamento, onde foram observados a presença de citocinas, número de colônias bacterianas viáveis e analise tecidual após o tratamento. Os dados mostraram que redução dos sinais inflamatórios foi detectado a partir do sétimo dia de tratamento com PgTeL desde que as lesões apresentavam tecido granulação e não apresentavam exsudato e edema; as lesões não tratadas apresentavam maior grau de inflamação. O tratamento com PgTeL nas duas doses reduziu em até 57% o número de colônias bacterianas na lesão em comparação ao controle infectado e aquele infectado e tratado com NaCl 0,15 M. As lesões cutâneas infectadas e tratadas com PgTeL 25 µg/mL e 100 µg/mL apresentaram área da lesão (±357,2 e ±326,5, respectivamente) menor do que daquelas não tratadas (±579,75). As citocinas pró inflamatórias IL-6, MCP-1 e TNF-alfa foram detectadas após três dias de experimento, sendo em menor quantidade nas lesões tratadas com PgTeL. A histologia demonstrou que após dez dias o tecido estava com ótimos sinais de reparo tecidual e ausência de infiltrado inflamatório. O estudo revelou que o uso tópico de PgTeL, foi eficiente no tratamento de feridas infectadas com *S. aureus*. O efeito antibacteriano *in vivo* detectado, indica que a lectina pode ser uma alternativa terapêutica para infecções causadas por bactérias.

Palavras chaves: Camundongo; Planta; Proteína; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

PgTeL lectin isolated from *Punica granatum* sarcotesta is a 26 kDa protein that has in vitro antibacterial and antifungal activity against human pathogens. The dissertation evaluated the in vivo antibacterial effect of PgTeL against *Staphylococcus aureus*, a gram positive bacterium that is widely found in the environment and in the human microbiota, which in many cases can lead to serious health problems. The lectin was isolated according to the previously established procedure. In the in vivo assay, lesions (8mm) induced in the dorsum region of mice were infected with *S. aureus* ATCC 6538 (0.5x 10 8 CFU/mL) and one day after infection, the wounds were treated daily for 10 days with PgTeL (25 and 100 µg/ml). The lesions were evaluated between 3 and 10 days for inflammatory parameters and after the end of treatment, where the presence of cytokines, number of viable bacterial colonies and tissue analysis were observed after treatment. The data showed that a reduction in inflammatory signs was detected from the seventh day of treatment with PgTeL since the lesions had granulation tissue and did not present exudate and edema; untreated lesions had a higher degree of inflammation. Treatment with PgTeL at both doses reduced the number of bacterial colonies in the lesion by up to 57% compared to the infected control and that infected and treated with 0.15 M NaCl. Infected skin lesions treated with PgTeL 25 µg/mL and 100 µg/mL showed a smaller lesion area (±357.2 and ±326.5, respectively) than those not treated (±579.75). The pro-inflammatory cytokines IL-6, MCP-1 and TNF-alpha were detected after three days of experiment, being in smaller amounts in the lesions treated with PgTeL. Histology showed that after ten days the tissue had excellent signs of tissue repair and no inflammatory infiltrate. The study revealed that the topical use of PgTeL was efficient in the treatment of wounds infected with S. aureus. The in vivo antibacterial effect detected indicates that the lectin may be a therapeutic alternative for infections caused by bacteria.

Keywords: Mouse; Plant; Protein; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

FIGURA 1. Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. Fonte: Kennedy et al. (1995) 19

FIGURA 2. Ensaio de hemaglutinação e de inibição da hemaglutinação em placas de microtitulação. Os círculos mostram representações esquemáticas da rede de eritrócitos formada pela lectina (A) e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres (B). Fonte: PAIVA et al. (2013) 20

FIGURA 3. Classificação de lectinas de plantas. Fonte: autor (2021) 23

FIGURA 4. *Punica granatum L.* (A) Hábito da planta; (B) inflorescência; (C) infrutescência em desenvolvimento; (D) fruto maduro; (E) fruto aberto, evidenciando as lojas onde as sementes estão alojadas; (F) e (G) sementes envoltas pela sarcotesta e (H) suco. Fonte: SILVA (2019). 31

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

FIGURA 01. Efeito do tratamento tópico com PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL) na carga bacteriana das feridas contaminadas por *Staphylococcus aureus* após 3 (A) e 10 dias (B) de tratamento. NINF e INF, ferida não infectada e infectada tratada com NaCl 01,5 M, respectivamente. A carga bacteriana é expressa em $x10^6$ UFC/mL. *** Diferenças estatisticamente significativas (p0.0001). 52

FIGURA 02. Efeito do tratamento tópico com PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL) na área da lesão cutânea contaminada por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* após 3 (A) e 10 (B) dias de tratamento. Área expressa em porcentagem (%), onde a área da lesão no dia 01 representa 100%. Em cada, valores com diferenças estatísticas entre os grupos são indicados por * ($p < 0.05$). 53

FIGURA 03. Efeito do tratamento tópico com a PgTeL (25 e 100 µg/mL) na severidade da inflamação nos animais submetidos à lesão cutânea contaminada por *Staphylococcus aureus*. (A) Análise dos parâmetros clínicos dos grupos experimentais durante o período de 10 dias. (B) Escala de severidade dos parâmetros clínicos dos animais estudados. Diferenças estatisticamente significativas são indicados por * ($p < 0.05$). 54

FIGURA 04. Análise macroscópica do efeito do tratamento tópico da PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL) em lesões cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus*. 56

FIGURA 05. Efeito do tratamento tópico com a PgTeL (25 e 100 µg/mL) na severidade da inflamação nos animais submetidos à lesão cutânea contaminada por *Staphylococcus aureus*. (A) avaliação da presença de citocinas do tipo TNF-alfa expressa em pg/mL (B) avaliação da presença de citicinas do tipo MCP-1 expressa em pg/mL (C) avaliação da presença de citocinas do tipo MCP-1 expressa em pg/mL. Diferenças estatisticamente significativas são indicados por * ($p < 0.05$). 57

FIGURA 6. Figura 6 – Análise histopatológica do processo antimicrobiano cutâneo em camundongos (*Swiss*) com lesão induzida cirurgicamente, e infectada por *S. aureus* e tratada com PgTeL.Não infectado, 3 dias (**A**) e 10 dias (**B)**; Infectado não tratado 3 dias (**C**) e 10 dias (**D**); Infectado e tratado com PgTeL 25 µg/mL 3 dias (**E**) e 10 dias (**F**); Infectado e tratado com PgTeL 100 µg/mL, 3 dias (**G**) e 10 dias (**H**). Aumento de 10X. HE. 59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

AH	Atividade Hemaglutinante
ATCC	American Type Culture Collection
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
IFN	Interferon
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF	Infectado
LPS	Lipopolissácarideo
M	Molar
MEGs	Elementos genéticos móveis
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
NINF	Não infectado
PgTeL	Lectina da sarcotesta de *Punica granatum*
PH	Potencial hidrogeniônico
PIR	Proteínas inativadoras de ribossomos
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VISA	*Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina
UFC	*Unidade Formadora de Colônia*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 17

2.1 OBJETIVO GERAL 17

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17

3 REFERENCIAL TEÓRICO 18

3.1 Lectinas 18

3.2 Purificação e caracterização de lectinas 21

3.3 Classificação de Lectinas 22

3.4 Atividade antibacteriana de lectinas 23

3.5 Resistencia antimicrobiana 26

3.6 *Staphylococcus aureus* 28

3.7 *Punica granatum L.* e a lectina da sarcotesta 30

4 ARTIGO: Avaliação *in vivo* dos efeitos antibacterianos da lectina de *Punica granatum* (PgTeL) 35

5 CONCLUSÃO 51

REFERÊNCIAS 52

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, as doenças infecciosas microbianas estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Sem dúvida, a descoberta dos antibióticos na década de 1930 revolucionou a Medicina e mudou o tratamento de doenças infecciosas, resultando em um aumento dramático na qualidade e na expectativa de vida das pessoas (AMINOV, 2016). No entanto, desde que essas drogas foram introduzidas, a resistência microbiana evoluiu e se espalha muito rapidamente (DAVIES & DAVIES, 2010). Toda essa realidade estimula o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções microbianas, como metodologias com base na modulação do sistema imunológico do hospedeiro (JANDÚ,2017).

As lectinas estão entre os compostos naturais com atividade antibacteriana. Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e são distribuídas em grande variedade de organismos incluindo algas, fungos, corais do mar, plantas superiores, procariontes, invertebrados e vertebrados. Elas estão envolvidas em muitos processos biológicos, como reconhecimento e ligação de carboidratos, interações patógeno-hospedeiro, direcionamento celular, comunicação célula-célula e indução de apoptose, metástase e diferenciação do câncer (AKKOUH,2015).

Dentre as lectinas existem as proteínas ligantes de quitina (polímero de N-acetil-glicosamina). Lectinas de diferentes especificidades a carboidratos possuem papéis importantes para muitas aplicações e terapias de doenças. Ensaios *in vivo* demonstram que as lectinas têm efeitos protetores contra vírus e microrganismos, são potentes moduladores da resposta imune, induzem mitose, inibem proliferação de células cancerígenas e podem ser usadas em sistemas de liberação de drogas. Também, glicanos alterados em células ou superfícies de tecido e amostras de soro podem ser identificados usando técnicas baseadas na especificidade das lectinas, tais como histoquímica e biossensores, detectando doenças e agentes infecciosos (COELHO et al, 2017).

A romãzeira, *Punica granatum* L., consiste em um arbusto lenhoso, ramificado, pertencente da família Lythraceae*,* nativa da região que abrange

desde o Irã até o Himalaia, a noroeste da Índia. Tem sido cultivada por muito tempo em toda a região Mediterrânea da Ásia, América, África e Europa (LORENZI & SOUZA, 2001; FERREIRA, 2004).

Esta planta possui uma ampla aplicação na medicina popular, sendo considerada como uma reserva de compostos bioativos (BEKIR et al., 2013). Seus frutos têm sido mencionados como um “superalimento” por conterem muitos compostos bioativos com enorme potencial para benefícios de saúde, sendo muito usado na medicina popular para tratar disenteria, infecções vaginais, faringite, gengivite e laringite (BEKIR, et al., 2013; HAGHAYEGHI, SHETTY & LABBÉ, 2013; LEGUA et al., 2016; SILVA et al., 2013).

A sarcotesta de *P. granatum* contém uma lectina denominada PgTeL (do inglês *P. granatum testa lectin*). PgTeL é uma proteína de 26 kDa cuja sequência de aminoácidos é semelhante a uma quitinase encontrada nas sementes de romã. PgTeL apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans e Candida krusei* (SILVA et al., 2018) e antibacteriana. Silva et al. (2016) relataram que a lectina inibe o crescimento e mata *Micrococcus luteus, Serratia marcescens e Streptococcus mutans*, é apenas bacteriostática contra *Aeromonas* sp*., Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella* sp*., Salmonella enterica* serovar Enteritidis*, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* e inibe a adesão de *Aeromonas* sp*., S. aureus, S. marcescens e a S. enterica* em células HeLa.

PgTeL também é um agente bacterostático e bactericida contra isolados clínicos de *S. aureus* (não-resistente e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)) e é capaz de interferir na agregação das células, provocar danos estruturais e inibir a formação de biofilme (SILVA et al., 2019a). Outros estudos mostraram a atividade antibacteriana da lectina contra isolados clínicos de *E. coli* produtores de *β*-lactamases e seu efeito sinérgico junto a antibióticos para os quais os isolados de *E. coli* são resistentes (SILVA et al., 2019b). PgTeL é um agente antibacteriano contras linhagens de *Listeria monocytogenes*, interferindo na viabilidade, formação de biofilme, adesão e invasão celular, capacidade quitinoélitica e causando alterações morfométricas nesta espécie (SILVA et al., 2020).

A detecção de atividade antimicrobiana de lectinas por ensaios *in vitro* permite a descoberta novos compostos e indica o mecanismo o mecanismo de ação antibacteriano. Contudo, o efeito no crescimento e viabilidade de bactérias *in vitro* nem sempre é detectado *in vivo* (SUN et al., 2016). Portanto, para a definição da eficácia de doses e segurança de uso como antibacteriano, são necessários avaliar parâmetros *in vivo* (BARTON et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antibacteriana *in vivo* de PgTeL utilizando o modelo de ferida enfectadas por *Staphylococcus aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar a lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) de acordo com procedimento previamente estabelecido;
- Produzir lesões na região do dorso dos camundongos e infectá-las com *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- Realizar tratamento tópico por 3 e 10 dias utilizando duas concentrações da lectina;
- Avaliar as lesões após o tratamento quanto a presença de exsudato e tecido de granulação, área da lesão, concentração das citocinas pró inflamatórias IL-6, MCP-1 e TNF-alfa e número de colônias bacterianas.
- Avaliar reparos tecidual após 3 e 10 dias de tratamento utilizando duas concentrações da lectina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lectinas

As lectinas são proteínas que apresentam atividade hemaglutinante enquanto não exibem atividade catalítica ou imunológica (LIS,1998). Essas proteínas apresentam uma ampla distribuição na natureza, sendo encontradas em microrganismos, algas, esponjas e veneno de serpentes. Em plantas já foram isoladas de diversos tecidos, tais como: cerne, casca, semente, folha, flor, raiz e rizoma (SILVA, 2019).

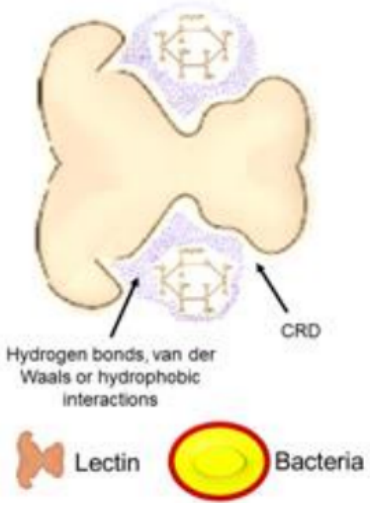
A primeira descrição sobre lectinas foi feita em 1888 quando Stillmark, ao estudar a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona), observou a capacidade de aglutinar eritrócitos e a atribuiu à presença de uma proteína, a ricina (KENNEDY et al., 1995). Pouco tempo depois, outra hemaglutinina, chamada abrina, foi descoberta em sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti). No entanto, o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar impulso com os trabalhos de Sharon e Lis em 1972, abrindo grandes possibilidades de aplicação para essas proteínas (GABOR et al., 2004; BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; JUAN et al., 2017).

O termo lectina (originado do latim *lectus*, que significa selecionado) refere-se à capacidade dessas proteínas de ligarem-se seletivamente a carboidratos (PAIVA et al., 2011). O termo aglutinina também é usado como um sinônimo para lectina, porque atribui-se à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (CARVALHO, 2013). Essas proteínas não possuem um caráter imunológico, o que as difere de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Ainda, os anticorpos são estruturalmente parecidos, enquanto as lectinas diferenciam-se entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, massa e estrutura tridimensional (PAIVA et al., 2013).

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes, podem conter carboidratos em sua estrutura sendo, portanto, glicoproteínas e são capazes de se ligar, de maneira reversível e específica, a mono e oligossacarídeos (Figura

1), que se apresentam em solução ou ligados à membrana celular (CORREIA et al., 2008; BONNARDEL,2020).

Figura 1: Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As setas representam pontes de hidrogênio e outras forças envolvidas a ligação. Fonte: PROCOPIO et al. (2017).

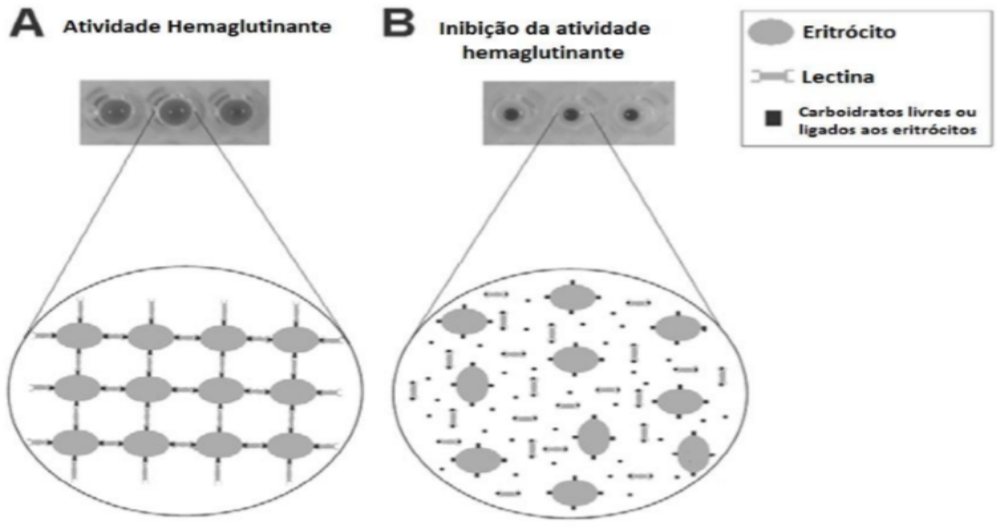


A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada pelo ensaio de atividade hemaglutinante, no qual ocorre a aglutinação devido a interação da lectina com carboidratos da superfície dos eritrócitos através de seus sítios, formando uma rede entre eles (Figura 2A). Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de outros animais, os quais podem ser tratados com enzimas (tripsina, papaína, entre outras) visando aumentar a interação lectina-eritrócito ou com reagentes químicos, como o glutaraldeído ou formaldeído, que promovem a fixação dos eritrócitos e possibilita o armazenamento deles por mais tempo (PAIVA et al., 2010; NAPOLEÃO et al., 2013).

A especificidade a carboidrato da lectina pode ser determinada através da realização do ensaio de atividade hemaglutinante em presença de carboidrato. Neste caso, a lectina é diluída em placa de microtitulação contendo solução de carboidratos livre e após incubação e adição dos eritrócitos, a aglutinação é determinada. A ausência de atividade hemaglutinante (Figura 2B) indica que a lectina reconheceu o carboidrato livre em solução e consequentemente, não

interagiu com o carboidrato da superfície dos eritrócitos. Assim, a especificidade da lectina é revelada. Lectinas de plantas podem apresentar especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanas), tais como ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e Nacetilmurâmico (VAN DAMME et al., 1998).

Figura 2. Ensaio de hemaglutinação e de inibição da hemaglutinação em placas de microtitulação. Os círculos mostram representações esquemáticas da rede de eritrócitos formada pela lectina (A) e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres (B).



Fonte: PAIVA et al. (2013)

O ensaio de atividade hemaglutinante pode também ser utilizado para investigar a interação de lectinas com eritrócitos de diferentes espécies animais. As lectinas podem apresentar especificidade para grupos sanguíneos humanos, como a lectina da polpa do fruto de *Aegle marmelos*, específica para eritrócitos do tipo A (RAJA et al., 2011), e do cogumelo *Marasmius oreades* específica para eritrócitos do tipo B (WINTER et al., 2002). Outras lectinas, no entanto, são caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos como a lectina da esponja *Cinachyrella apion* (MEDEIROS et al., 2010), que aglutina todos os tipos de eritrócitos humanos.

3.2 Purificação e caracterização de lectinas

A purificação de lectina é um processo essencial para o entendimento de sua estrutura proteica e atividade biológica. O procedimento de purificação envolve várias etapas e a quantificação de proteínas é realizada frequentemente através de metodologias colorimétricas como Lowry (LOWRY, 1951) e Bradford (BRADFORD, 1976).

O procedimento de purificação é iniciado com a extração da proteína com água, NaCl 0,15 M ou solução tampão. Em geral, após a extração é realizada uma etapa de precipitação da proteína utilizando-se o sal sulfato de amônio em diferentes faixas de concentração. O sal por ser altamente solúvel retira a camada de solvatação da proteína, o que resulta na precipitação de algumas proteínas. A fração proteica é então dialisada para eliminação do sal e o isolamento da proteína pode ser realizado por meio de métodos cromatográficos. Os processos cromatográficos também podem separar formas desnaturadas e nativas da proteína (COELHO et al., 2012).

A cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão molecular são métodos eficientes em isolar lectinas desde que exploram as diferenças entre elas quanto a bioafinidade, carga e tamanho, respectivamente. Os suportes para cada tipo exibem características que viabilizam a separação como presença de ligante (afinidade), carga (troca iônica) e poros (exclusão molecular). A cromatografia de afinidade, dentre os métodos cromatográficos, é a mais utilizada por sua grande eficiência em isolar lectinas com alto padrão de pureza. Os suportes para cromatografia de afinidade para isolamento de lectinas contêm carboidratos e o processo de separação se dá quando a lectina se liga ao suporte via seu sítio de ligação a carboidrato. São exemplos de suportes a quitina, agarose, gel de guar (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; SOUSA et al., 2011; COELHO et al., 2012).

A caracterização de lectinas pode ser realizada por várias técnicas, onde uma muito usada é a pôr eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), método que se baseia na migração de partículas carregadas, influenciadas por um campo elétrico, sendo útil na avaliação do grau de pureza de estruturas

moleculares. Quando realizada em presença do agente desnaturante sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) revela a massa molecular da proteína desnaturada e a inclusão do agente redutor β-mercaptoetanol no processo, mostra a composição de subunidades (PAJIC et al., 2002).

3.3 Classificação de Lectinas

As lectinas apresentam uma enorme variedade estrutural, mas uma característica comum a todas é a presença de pelo menos um sítio de ligação a carboidratos, que corresponde ao chamado domínio de reconhecimento de carboidrato (GABIUS 1994; ZANETTI, 2007; LAM; NG, 2011; CARVALHO et al., 2018). Existem várias classificações para as lectinas que levam em consideração diferentes critérios.

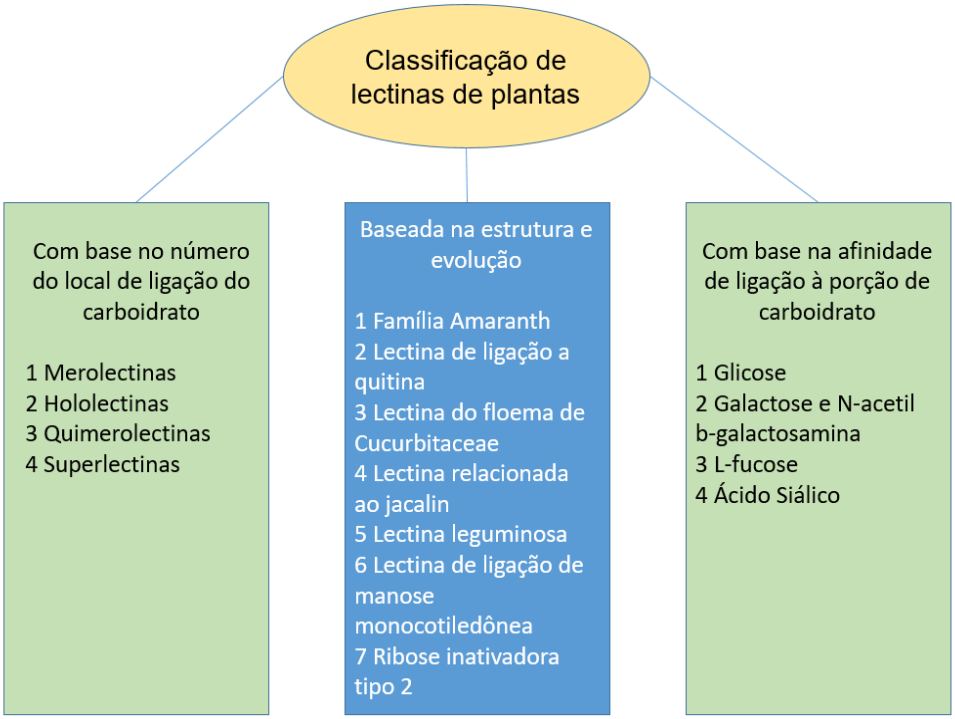
As lectinas de plantas têm sido subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Merolectinas são aquelas proteínas que possuem apenas um domínio de ligação a carboidratos e, por esse motivo, não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas possuem dois ou mais domínios idênticos de ligação a carboidratos, fazendo assim com que haja aglutinação de células e/ou precipitação de glicoconjugados. A maior parte das lectinas de plantas pertence a esse grupo. As quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não-relacionado, o qual pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, agindo independentemente dos domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos não idênticos que reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. Um exemplo de superlectina, é a lectina de bulbo de tulipa TxLCI, que contém dois domínios diferentes de ligação a carboidratos, que liga especificamente resíduos de manose e N-acetil-Galactosamina (VAN DAMME et al., 1997).

Existe também a classificação que leva em consideração os aspectos estruturais e evolutivos das lectinas. Nesta, as lectinas são agrupadas como:

amarantinas, lectinas de ligação à quitina, lectinas do floema de *Cucurbitaceae*, lectinas relacionadas a Jacalin, lectinas de leguminosas, lectinas de ligação de manose monocot e as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (PIR) (MISHRA, 2019).

As lectinas ainda podem ser classificadas de acordo com a especificidade a um ou mais carboidratos sendo lectinas ligadoras de galactose (ADAMUDE et al., 2020), manose (JONES et al., 2017), N-acetilglicosamina (GOMES et al., 2013) ou D-glicose/manose (ROSAS, 2019) entre outros açúcares. A figura 3 resume as diversas classificações e os critérios utilizados em cada uma delas.

Figura 3: Classificação de lectinas de planta



Fonte: autor (2021).

3.4 Atividade antibacteriana de lectinas

A importância das lectinas no processo de defesa de animais ou plantas pode ter evoluído de sua capacidade de aglutinar e imobilizar células, bem como de gerar uma toxicidade para microrganismos que podem resultar em morte ou inibição de crescimento, onde todo esse processo se dá por mecanismos de defesa envolvidos em organismos multicelulares, apresentando um papel importante na imunidade inata (GOMES et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2017).

A atividade antibacteriana de lectina está relacionada aos epítopos de glicanos semelhantes que se apresentam na superfície da célula patogênica, que podem constituir locais-alvo para a interação da lectina (WOHLSCHLAGER et al., 2014). A membrana bacteriana é composta por glicoconjugados tais como glicoproteínas, glicolipídios, glicosaminoglicanos e proteoglicanos. A apresentação dessas moléculas é específica para cada tipo de espécie bacteriana e esses carboidratos constituem alvos de ligação de lectinas com atividade antibacteriana (PAIVA et al., 2010).

Estudos tem sugerido que lectinas podem formar poros na parede celular, induzindo a morte bacteriana pelo extravasamento do conteúdo celular (CORREIA et al., 2008). Essa hipótese tem sido corroborada, pois algumas classes de lectinas são capazes de reconhecer alvos bacterianos, como é o caso da lectina RegIII, que se liga ao peptideoglicano presente na parede celular, e através dessa ligação são formados poros, que levam ao aumento da permeabilidade da célula bacteriana levando ao extravasamento celular (MUKHERJEE et al., 2014).

Entretanto, a parede celular das bactérias constitui uma barreira para as interações entre glicoconjugados na membrana bacteriana e lectinas, onde elas funcionam como proteínas de ligação a carboidrato, impedindo a passagem dessas proteínas na célula. Assim, a atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas depende da interação da lectina com componentes da parede celular bacteriana, como ácidos teico-teico-teicurônico, peptidoglicanos e LPSs, através de ligações fracas como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (PAIVA et al., 2010). A atividade antibacteriana de lectinas já foi demostrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Estudo *in vivo* utilizando peixes (ZHOU & SUN, 2015) avaliou a atividade antibacteriana da lectina recombinante CsCTL1 extraída de teleósteos e foi demonstrado que a lectina ligou as bactérias e isso resultou em fagocitose por monócitos. Assim os peixes tratados com amostras recombinates rCsCTL1 exibiram maior resistência contra infecções bacterianas.

Arasu et al. (2017) em um estudo *in vivo* mostraram que a lectina CsLTL-2, em baixas concentrações, inibiu a bactéria *Escherichia coll* em brânquias de peixes. A presença da lectina ligada à membrana bacteriana foi detectada e foi demostrado que a diminuição do número de células viáveis se deu pela ruptura da membrana a partir da ligação de CsLTL-2.

Outro estudo avaliou a atividade antibacteriana de três lectinas recombinantes isoladas de *Cynoglossus semilaevis* denominadas rCsBML1, rCsBML2 e rCsBML3 foi demonstrado que elas apresentam ampla capacidade de se ligar a bactérias de maneira dependente da dose e com diferentes afinidades. Nesse estudo as lectinas rCsBML1 e rCsBML2, mataram as bactérias alvo *in vitro* e inibiram a disseminação bacteriana nos tecidos de peixes *in vivo* (SUN et al., 2016).

Velayutham et al. (2017) investigaram a atividade antibacteriana *in vitro* da lectina da hemolinfa de *Oryctes rhinoceros.* A lectina apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *B. pumilusn*, isoladas do habitat larval nativo de *O. rhinoceros*.

A atividade antibacteriana da lectina isolada da semente de *Moringa oleifera* e denominada WSMoL, tem sido demonstrada em estudos *in vitro*. Moura et al. (2017) mostraram que a lectina foi ativa sobre *Serratia marcescens*, inibindo a formação de biofilme em baixas concentrações e o crescimento bacteriano, em concentrações mais altas e sobre *Bacillus* sp, inibindo o crescimento em todas as concentrações testadas. Ferreira et al. (2011) revelaram a atividade antibacteriana de WSMoL contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Estudos que trazem de atividade antimicrobiana como ponto chave da pesquisa, demonstram a habilidade de lectinas em reconhecer especificamente

carboidratos e isso permite o emprego dessas proteínas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas (GAO et al., 2010). Outros também analisaram os diferentes modelos de aglutinação de bactérias geradas por 23 lectinas e mostraram que a comunicação lectina-bactéria é uma boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium* (ATHAMNA et al.,2006).

Os estudos mostram que lectinas antimicrobiana são candidatos promissores para uso como agentes antibióticos. As lectinas merecem bastante atenção, uma vez que são capazes de afetar a fisiologia dos microrganismos ao interagir com carboidratos presentes na parede celular de bactérias, favorecendo a inibição do crescimento e a lise celular, dentre outros efeitos (GOMES et al., 2014).

3.5 Resistencia antimicrobiana

Com a introdução de drogas eficientes no combate às infecções, melhorias significantes no tratamento médico das doenças infecciosas foram observadas, ocasionando assim uma considerável diminuição nas taxas de morbidade e mortalidade em todo mundo, o que permitiu grandes progressos na Medicina (COSTA et al., 2012).

Segundo Guimarães et al. (2010), os antibióticos podem ser classificados: de acordo com sua origem em antibióticos naturais, quando são extraídos a partir de organismos vivos; antibióticos semissintéticos, que são substâncias de origem natural que são submetidas a processos de síntese em laboratório; ou antibióticos sintéticos, que são produzidos exclusivamente em laboratório.

Outra classificação para antibióticos leva em conta a ação do composto sobre as células bacterianas. Assim, eles são considerados bacteriostáticos ou bactericidas se inibem o crescimento ou matam as bactérias, respectivamente (MEIRELES, 2008). Os antibióticos também são analisados pelos mecanismos farmacodinâmicos pelos quais atuam, que vão desde a inibição da síntese de

ácidos nucléicos até a interferências no metabolismo celular (GUIMARÃES et al. 2010).

O uso indiscriminado de antibióticos em animais e humanos tem promovido a evolução da resistência. É preocupante a forma como os antibióticos vem sendo utilizados em ambientes ambulatoriais, hospitalares e domésticos no tratamento ou profilaxia de doenças humanas, bem como na pecuária (MEIRELES, 2008).

O aumento da resistência diminui as opções de fármacos efetivos para o tratamento de tais infecções com consequente aumento nas complicações clínicas de pacientes hospitalizados. Assim, o aumento do tempo de internação hospitalar dos pacientes, eleva os custos direcionados à recuperação dos doentes e cria um problema de saúde pública (DA COSTA & JUNIOR, 2017).

A resistência a cada novo antibiótico, independentemente de seu mecanismo de ação, tem sido descrita logo após seu primeiro uso clínico. Como consequência da seleção natural, os patógenos bacterianos evoluem para sobreviver e fugir das drogas destinadas a eliminá-los, como fizeram por milhões de anos contra antibióticos naturais produzidos por organismos concorrentes em seu ambiente (SURETTE & WRIGHT, 2017).

Estudos de 2008 já mostravam que em um futuro bem próximo, seria altamente provável que nenhuma opção de tratamento estaria disponível para os patógenos “ESKAPE”, incluindo as bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (RICE, 2008). Assim sendo, o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos é essencial para acompanhar a resistência em constante evolução das bactérias. No entanto, poucas novas classes de drogas antibacterianas foram descobertas nos últimos 30 anos (FERNANDES & MARTENS, 2017).

3.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano e foi reconhecido pela primeira vez como o agente etiológico de abscessos supurativos há mais de 130 anos (OGSTON, 1984). É uma bactéria Gram-positiva, que tem a forma de cocos e tende a se organizar em cachos descritos como "cachos de uva". Esses microrganismos podem crescer até 10% de sal e as colônias costumam apresentar em uma cor dourada ou amarela. Os mesmos organismos podem crescer aerobicamente ou anaerobicamente (facultativo) e em temperaturas que varia entre 18 e 40 ºC (VIEIRA et al, 2010).

Os testes de identificação bioquímica típicos incluem catalase positiva (todas as espécies de *Staphylococcus* patogênicas), coagulase positiva (para distinguir *S aureus* de outras espécies de *Staphylococcus*), sensível à novobiocina (para distinguir de *Staphylococcus saprophyticus*), e fermentação de manitol positiva (para distinguir de *Staphylococcus epidermidis*) (RASIGADE & VANDENESCH, 2014).

As infecções causadas por *S. aureus* são comuns em ambientes da comunidade em que se vive e em hospitais e a transmissão normalmente ocorre por contato direto. No entanto, algumas infecções envolvem outros métodos de transmissão (RASIGADE & VANDENESCH, 2014). O tratamento de infecções por *S. aureus* continua sendo um desafio devido ao surgimento de cepas multirresistentes, como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente *à meticilina*) (BOUCHER & COREY, 2008).

S. aureus é uma bactéria encontrada no meio ambiente e na microbiota humana normal, localizada na pele e nas membranas mucosas, com mais frequência na área nasal da maioria dos indivíduos saudáveis. *S. aureus* normalmente não causa infecção na pele saudável, no entanto, se for permitido entrar na corrente sanguínea ou nos tecidos internos, essas bactérias podem causar uma variedade de infecções potencialmente graves (LOWY, 1998).

São os mais comuns microrganismos causadores de infecções superficiais na pele produzindo erupções pruriginosas acompanhadas de coceira

intensa. Podem também causar também infecções invasivas em regiões mais profundas como músculos, vísceras e tecidos ósseos, provocar problemas graves, tais como choque séptico, endocardite, infecção pulmonar e meningite, e podem promover intoxicações alimentares ao homem por intermédio da produção de enterotoxinas (KOOKEN et al., 2012; FOSTER et al., 2014; LEE et al., 2016).

Um dos grandes problemas no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* é a sua grande capacidade de adquirir resistências aos fármacos usados na Medicina. Isso se dá por elementos genéticos móveis (MGEs) que desempenham um papel primordial na capacidade do *S. aureus de* se adaptar aos estresses ambientais, que incluem a exposição a antibióticos. Estes MGEs são o meio principal pelo qual a informação genética é trocada entre as bactérias por meio da transferência horizontal de genes. As cepas de *S. aureus* em geral contêm uma variedade relativamente grande de MGEs, incluindo plasmídeos, transposons, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade e cromossomos de cassete estafilocócica. Os plasmídeos e cromossomos cassete estafilocócicos em particular têm desempenhado um papel central em conferir resistência a antibióticos β-lactâmicos e vancomicina (MCGUINNESS et al., 2017).

As primeiras infecções causadas por PRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Penicilina) foram disseminadas entre hospitais e em ambientes comunitários durante os anos 1950 e início dos anos 1960 (RAMMELKAMP & MAXON, 1942; BARBER et al., 1948). Um grande número de isolados clínicos foi categorizado por tipo de fago como 80/81 (a cepa pandêmica do fago de *S. aureus* 80/81), que mais tarde foram classificados predominantemente como tipo de sequência multilocus (MLST ou ST) 30 e complexo clonal 30 (CC30). Toda a resistência de *S. aureus* à penicilina se dá principalmente pela presença do gene *blaZ*, que codifica uma β-lactamase. A β-lactamase inativa a penicilina por meio da hidrólise do anel β-lactâmico da penicilina (OLSEN, CHRISTENSEN & AARESTRUP, 2006).

Existe ainda o VISA (*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina), que teve seu primeiro caso relatado no Japão em 1997. Essa resistência se dá pela presença de um fenótipo conhecido em laboratório como hVISA (HOWDEN

et al., 2006). Coletivamente, os estudos fornecem um grande suporte para a noção de que o desenvolvimento de hVISA é um processo epigenético, e não dependente de uma mutação do gene. Uma hipótese aceita atualmente é que o VISA, que tem resistência homogênea à vancomicina, se desenvolve a partir do hVISA em indivíduos tratados com antibióticos glicopeptídicos por longo período (ROCH et al., 2014; HAABER et al., 2015). Como características fundamentais o fenótipo VISA inclui o aumento da espessura da parede da célula, causada pela biossíntese da parede celular diferencialmente regulada por vias estimuladoras, reduzindo a reticulação de peptidoglicano e a diminuição da atividade autolítica das enzimas responsáveis a rotatividade da parede celular (MCGUINNESS et al, 2017).

Diante de todo o quadro de resistência e características do microrganismo, os dados demostram que as infecções causadas por *S. aureus* podem causar sérios danos ao organismo hospedeiro devido a vários fatores de virulência, como formação de biofilme, agregação, ação hemolítica e secreção de proteases (TANG et al., 2017; KONG et al., 2018). Infecção sanguínea por *S. aureus* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade de pacientes em hemodiálise, particularmente aqueles dependentes de cateteres venosos centrais para acesso vascular (CONNOLLY et al., 2019).

3.7 *Punica granatum* L. e a lectina da sarcotesta

Punica granatum L. (Figura 4) faz parte da família Lythraceae e pertence à ordem Myrtales, segundo a APG II (2003). A família Lythraceae e possui distribuição pantropical, com algumas espécies nativas de regiões temperadas. Compreende aproximadamente 30 gêneros e 600 espécies (MOSTAFA et al., 2018). *P granatum* e corresponde a um arbusto decíduo que tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional em muitas regiões do mundo (SHAYGANNIA et al., 2016).

Figura 4: *Punica granatum* L. (A) Hábito da planta; (B) inflorescência; (C) infrutescência em desenvolvimento; (D) fruto maduro; (E) fruto aberto, evidenciando as lojas onde as sementes estão alojadas; (F) e (G) sementes envoltas pela sarcotesta e (H) suco.

Fonte: SILVA (2019)

É uma das primeiras frutas domesticadas que foram cultivadas em tempos passados. É originária do Irã e dos países próximos, de onde se disseminou gradualmente nas regiões da Ásia Central, para o Himalaia, Eyalet da Anatólia, Oriente Médio e região do Mediterrâneo. Também presente no Arizona e na Califórnia, e foi cultivada na região do Mediterrâneo, sul da Ásia e países do Oriente Médio. Hoje, a romã é cultivada na maioria das regiões do mundo (BEHZADI, 1998).

A romãzeira possui em média de 2 a 3 m de altura, glabra, com vários troncos e aparência espessa. As folhas apresentam uma característica lisa e sem pelos, com uma aparência brilhante na parte superior da folha. Os frutos se tornam maduros dentro de 5 a 8 meses depois de começar a se formar. Durante esse processo, a cor da parte externa da fruta passa por mudanças que vão

desde o amarelo, verde ou rosa para totalmente vermelho, rosa ou roxo profundo (HOLLAND et al., 2009).

O fruto da romãzeira dispõe de um pericarpo carnoso-coriáceo dividido internamente em muitas lojas, contendo diversas sementes irregularmente facetadas. A testa é um tecido oriundo do óvulo e é formada por células polposas e dividida em uma mesotesta esclerótica e uma sarcotesta translúcida, a qual envolve as sementes. A sarcotesta apresenta-se em um material gelatinoso de coloração rósea, é comestível e pode ser removida física, química ou mecanicamente (LOPES et al., 2001).

A planta possui ampla aplicação na medicina popular, sendo considerada como uma reserva de compostos bioativos (BEKIR et al., 2013). Seus frutos têm sido mencionados como um “superalimento” por conter muitos compostos bioativos com enorme potencial para benefícios de saúde, sendo muito usado na medicina popular para tratar a disenteria, infecções por fungos vaginais, dores de garganta, faringite, gengivite e laringite (BEKIR et al., 2013; HAGHAYEGHI, SHETTY & LABBÉ, 2013; LEGUA et al., 2016; SILVA et al., 2013).

A casca de frutas secas é usada no leite ou na água para dores no corpo no Paquistão e mastigada para aliviar a tosse. As folhas trituradas são usadas na região da Índia para estancar sangramentos nasais. No Nepal, a planta é utilizada para tratar dores no peito, dor de garganta e bronquite. É conhecida pelas suas atividades estomacais, adstringentes, anti-helmíntico, antidiarreico, diurético, expectorante, hemostático e afrodisíaco (BUSSMANN et al., 2020).

A presença de um nível significativo de compostos como polifenóis, taninos e antocianinas gerou um grande interesse pela romã como um fruto funcional com propriedades promotoras de saúde significativas (SHARMA E THAKUR, 2016; ELFALLEH et al., 2012). Dentre suas atividades podem ser citadas a atividade antibacteriana de extratos de casca de *P. granatum* em diferentes concentrações contra as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella enterica, Shigella sonnei, Enterococcus faecalis e Bacillus subtilis* (PAGLIARULO et al., 2016; ROSAS-BURGOS et al., 2017). Atividade antifúngica também já foi relatada contra *Candida albicans* e *Candida krusei* (SILVA et al., 2018). Outros estudos revelaram ação

contra biofilmes dentários (SANTOS, 2019), modulação de respostas antiinflamatórias (ARUN; SINGH, 2012), capacidade de combater a obesidade (AL-MUAMMAR et al., 2012; BEKIR et al., 2013) e as atividades antioxidante e antiproliferativa (LUCCI et al., 2015).

Bekir et al. (2013), demostraram que os extratos metanólicos e etanólicos das folhas de *P. granatum* continham compostos com atividade antioxidante, antiinflamatória, anticolinesterase e antiproliferativa. Também foram apresentados resultados onde a romã demonstrou efeitos anti-proliferativos, anti-metastáticos e anti-invasivos em várias linhagens celulares de câncer *in vitro*, bem como em modelo animal *in vivo* ou em ensaios clínicos em humanos (PANTH; MANANDHAR; PAUDEL, 2017). Em estudos sobre atividade neuroproterora, foi demonstrado que o extrato aquoso e etanólico de flores da romã apresentaram ação frente a demência associada à doença de Alzheimer (BHASKAR; KUMAR, 2012; BEKIR et al., 2016), gerou redução da deposição de amilóide em um modelo de camundongo da doença de Alzheimer (HARTMAN et al., 2006) e reduziu degenerações neuronais em um cérebro hipóxico-isquêmico neonatal de camundongo modelo de lesão (LOREN et al., 2005).

A sarcotesta da romã contém uma lectina denominada PgTeL (do inglês *P. granatum testa lectin*), cujo procedimento de purificação compreende a solubilização das proteínas da sarcotesta em NaCl 0,15 M, precipitação de proteína com sulfato de amônio (30% de saturação) e etapa cromatográfica em coluna de quitina, uma vez que a lectina tem a capacidade de se ligar a esse carboidrato. A estrutura primária de PgTeL apresentou homologia (37%) com a de uma quitinase isolada das sementes de *P. granatum*.

PgTeL não apresentou toxicidade sobre células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) e possui atividade antifúngica contra *Candida* por causar estresse oxidativo, colapso energético, rompimento da parede celular, danos estruturais nas células e inibição da formação de biofilme (SILVA et al., 2018).

Silva et al. (2016) mostraram que PgTeL, em testes *in vitro,* apresentou atividade bacteriostática contra cepas de *Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus*

saprophyticus, Streptococcus mutans, Aeromonas sp.*, Escherichia coli, Klebsiella sp., Salmonella enterica serovar. Enteritidis* e *Serratia marcescens* e bactericida contra *M. luteus, S. mutans, S. marcescens*. Adicionalmente, os autores mostraram que as capacidades adesiva e invasiva de *Aeromonas* sp., *S. aureus*, *S. marcescens* e *S. enterica* foram reduzidas quando as células dessas bactérias foram previamente tratadas com PgTeL.

PgTeL também apresentou atividade bacterostática e bactericida contra isolados clínicos de *S. aureus* (não-resistente e MRSA) e foi capaz de interferir na agregação das células, provocar danos estruturais e inibir a formação de biofilme (SILVA et al., 2019a). Estudo também revelou que PgTeL tem atividade antibacteriana contra isolados clínicos de *Escherichia coli* produtores de *β*-lactamases e apresenta potencial sinérgico junto a antibióticos para os quais os isolados de *E. coli* são resistentes (SILVA et al., 2019b). Além disso, PgTeL é um bom agente antibacteriano contras linhagens de *Listeria monocytogenes* interferindo na viabilidade, formação de biofilme, adesão e invasão celular, capacidade quitinolítica e causando alterações morfométricas nesta espécie (SILVA et al., 2020).

A indicação de atividade antimicrobiana de lectinas por ensaios *in vitro* permite a descoberta novos compostos antimicrobianos e seu modo de ação, enquanto ensaios *in vivo* pode promover avaliações pré-clínicas para abordar eficácia, segurança e a melhor dosagem (BARTON et al., 2014). Assim, a investigação de PgTeL em ensaios *in vivo*, foi o objetivo dessa dissertação.

ARTIGO

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS ANTIBACTERIANOS DA LECTINA DE P*unica granatum* (PgTeL).

Simeone Júlio dos Santos Castelo Branco[1], Lucas dos Santos Silva[2], Izadora Souza Soeiro Silva[2], Abdênego Rodrigues da Silva[3], Juliane Nancy de Oliveira Silva[1], Pollyanna Michelle da Silva[1], Thiago Henrique Napoleão[1], Luís Cláudio Nascimento da Silva[2], Patrícia Maria Guedes Paiva[1].

1. Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Departamento de Biologia Microbiana, Universidade Ceuma, Matriz, 65075-120, São Luís, Maranhão, Brasil.
3. Departamento de Ciências Biológicas-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, as doenças infecciosas microbianas estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Sem dúvida, a descoberta dos antimicrobianos trouxe uma grande revolução na Medicina e mudou o tratamento de doenças infecciosas, resultando em um aumento dramático da qualidade e na expectativa de vida das pessoas (AMINOV, 2017). No entanto, desde que essas drogas foram introduzidas, a resistência microbiana evoluiu e se espalha muito rapidamente (DAVIES & DAVIES, 2010). Toda essa realidade estimula o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções microbianas (JANDÚ, 2017).

Punica granatum L., conhecida popularmente como romãzeira é uma planta que compreende aproximadamente 30 gêneros e 600 espécies (MOSTAFA et al., 2018) e que possui uma distribuição pantropical, com algumas espécies nativas de regiões temperadas. A planta é considerada como uma reserva de compostos bioativos (BEKIR et al., 2013) e possui uma ampla

aplicação na medicina popular. Os frutos têm sido mencionados como um “superalimento” com enorme potencial para benefícios de saúde, sendo muito usado na medicina popular para tratar a disenteria, infecções vaginites, faringite, gengivite e laringite (BEKIR et al., 2013; HAGHAYEGHI, SHETTY & LABBÉ, 2013; LEGUA et al., 2016; SILVA et al., 2013).

Lectinas constituem uma classe de proteínas ligantes a carboidratos e glicoconjugados que estão envolvidas numa grande diversidade de fenômenos. As lectinas de origem vegetal, estão envolvidas em fenômenos de defesa e funcionam também como proteínas de reserva (BELTRAMINI, 2017). A sarcotesta de *P. granatum* contém uma lectina denominada PgTeL (do inglês *P. granatum testa lectin*) que é uma proteína de 26 kDa com sequência de aminoácidos semelhante a quitinase encontrada nas sementes de romã. SILVA et al. (2016) mostraram que PgTeL é um agente bactericida e bacteriostático contra *Micrococcus luteus, Serratia marcescens* e *Streptococcus mutans*, apenas bacteriostático contra *Aeromonas* sp*., Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella* sp*., Salmonella enterica serovar Enteritidis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* e que a lectina inibiu a adesão de *Aeromonas* sp*., S. aureus, S. marcescens* e *S. entérica* em células HeLa. A lectina também tem atividade antifúngica contra *Candida albicans e Candida krusei* (SILVA et al., 2018). Outros estudos demonstraram a capacidade da PgTeL de inibir o crescimento de cepas de *S. aureus* não resistentes e cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (SILVA et al, 2019).

Staphylococcus aureus é um microrganismo residente na pele e nas membranas nasais que causa graves infecções em indivíduos internados ou não em hospitais (HUMPHREYS, 2012). As infecções causadas por *S. aureus* variam em gravidade, desde infecções leves da pele até pneumonia necrotizante grave e têm sido consideradas a principal causa de bacteremia, endocardite infecciosa e infecções osteoarticulares e pleuropulmonares (TONG et al., 2015). A frequência de infecções por *S. aureus* está aumentando e seu tratamento está se tornando mais difícil (OLIVEIRA, BORGES & SIMÕES, 2018).

O uso contínuo de antibióticos pode fazer com que bactérias desenvolvam mecanismos de adaptação e resistência a eles, onde a mesma pode acontecer de maneira intrínseca ao uso de antibióticos ou de forma adquirida (GUO et al., 2020). Diante destes fatos, tem-se havido uma busca por novos agentes antibacterianos visando ampliação da rotatividade de compostos bem como a identificação de compostos que reduzam o crescimento e a sobrevivência de bactérias resistentes. Este trabalho reporta o efeito antibacteriano *in vivo* de PgTeL contra *S. aureus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de PgTeL

Frutos de *Punica granatum* foi coletada em Glória do Goitá (Pernambuco, Brasil), com autorização (36.301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. A sarcotesta foi peneirada (malha de 1 mm) e PgTeL foi isolada a partir dela conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2016). Resumidamente, a sarcotesta foi misturada com NaCl 0,15 M (na proporção de 9:1, v/v) durante 6 h com auxílio de um agitador magnético. Em seguida, a mistura foi filtrada através de gaze, centrifugada (3000 *g*, 15 min, 4ºC) e o sobrenadante coletado (extrato) foi tratado com sulfato de amônio a 30% (p/v) durante 4 h sob agitação magnética (GREEN & HUGHES,1995). Em seguida, o material foi centrifugado (3000g, 15 min, 4ºC) e o sobrenadante coletado e dialisado contra NaCl 0,15 M (fração) foi aplicado (4,0 mg de proteína) a uma coluna de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M. PgTeL foi recuperada após eluição da coluna com ácido acético 1 M. O extrato, fração e PgTeL foram avaliados quanto à concentração de proteína (LOWRY et al.,1951) usando curva padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL) e atividade hemaglutinante (AH) usando eritrócitos de coelho conforme Silva et al. (2016).

Avaliação de atividade antimicrobiana in vivo

Protocolo para indução da ferida

O projeto foi submetido ao Comitê de ética para experimentação animal da Universidade CEUMA e aprovado com o Cep Nº 013/18. Para realização do procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 1 mg/kg e cloreto de cetamina 50 mg/kg por via intramuscular. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia e a antissepsia da região dorsal torácica com álcool etílico a 70% (v/v) e solução de NaCl 0,15 M estéril. A pele foi demarcada usando-se um molde de papel adesivo (0,64 cm^2), previamente esterilizado e a ferida cutânea asséptica foi produzida por excisão da pele com tesoura de pontas tipo romba e pinça de dissecção, até sua total ressecção. Em seguida, uma suspensão bacteriana recente de *S. aureus* ATCC 6538 (50 µL, 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) /mL) foi adicionada à lesão (ORTINES et al., 2018). O tratamento correspondeu a aplicação tópica de 50 µL de PgTeL nas concentrações correspondente a 4x CMI (25 µg/mL) e 16x CMI (100 µg/mL) (EL-KASED et al., 2017) ou NaCl 0,15 M (50 µL) um dia após a infecção das feridas e aplicações diárias durante 3 e 10 dias. Os camundongos foram divididos nos grupos G1 (animais com feridas assépticas tratados com NaCl 0,15 M), G2 (animais com feridas infectadas tratados com NaCl 0,15 M), G3 (animais com feridas infectadas tratados com PgTeL 25 µg/mL) e G4 (animais com feridas infectadas tratados com a PgTeL 100 µg/mL). Para cada ponto de coleta de amostras (3º e 10º dias de tratamento) foram sacrificados seis animais.

Avaliação clínica da lesão

As feridas foram avaliadas diariamente, observando-se na área circunscrita os seguintes parâmetros: hiperemia, edema, hematoma, sangramento,

secreção, odor, prurido, presença e característica das crostas, presença necrose, coloração e aspecto do tecido de granulação e cicatricial. Todas as feridas foram fotografadas e os diâmetros foram medidos para a mensuração da área da lesão utilizando-se a equação: A = π. R. r. Onde A representa a área (cm^2); “R”, o raio maior e “r”, o raio menor. O grau de contração será expresso em percentual, será mensurado pela equação: 100X (Wo –Wi)/Wo = % de contração. Wo área inicial da ferida e Wi = área no dia da biópsia.

Contagem de bactérias viáveis

O lado dorsal da ferida foi removido e usado para contagem de bactérias. Para recuperação das bactérias, amostras das lesões infectadas foram colocadas em tubos contendo 1 µL de tampão fosfato de sódio (PBS), 0,01 M, pH 7,4. Após homogeneização (90 s a 2800 *g*), as misturas foram diluídas oito vezes de forma seriada e plaqueadas em Agar Manitol Salgado e as placas foram incubadas a 37ºC por 24 h. Os valores de unidades formadoras de colônia (UFC) foram determinados por método padrão de contagem de colônias.

Dosagem de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-12p70, IL-10, IL-6, MCP-1 TNF-α, INF- gama, foram quantificados nas amostras das lesões através de kits de dosagens de ELISA (Becton, Dickinson- BD). O óxido nítrico (NO) foi dosado no tecido da lesão usando Reagente de Griess (DA SILVA et al., 2015), e a concentração de proteína em cada amostra foi quantificada pelo reagente de Bradford (Sigma-Aldrich; S˜ São Paulo, SP, Brasil) usando uma curva padrão (0–500 µg/mL de albumina sérica bovina). Em todos esses ensaios, os valores de absorbância foram obtidos usando um espectrofotômetro (Plate reader MB-580; Heales, Shenzhen, China).

Análises Histopatológicas

Imediatamente após a retirada da pele, as amostras foram fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01 M, pH 7,2 por 48 h e, em seguida, o PBS foi substituído por solução de etanol 70% (v/v). Cada fragmento de pele foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em Xilol e incluídos em parafina. Após microtomia (5 µm de espessura), os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson. Três cortes paralelos foram obtidos para cada espécime e fotografados (aumento de 40x) para quantificação de células polimorfonucleares, mononucleares e fibroblastos/mioblastos e vasos sanguíneos. A produção de colágeno foi avaliada em fragmentos seccionados (3 µm) da lesão corada com PicroSirius.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. As porcentagens de inibição foram calculadas como a média das inibições obtidas para cada experimento individual. Os gráficos e a avaliação estatística dos resultados foram realizados por meio de análise de variância (ANOVA) no programa Graphpad Prism 5.0, seguida pelo teste de Boferroni. Adotou-se o nível de significância menor a 0.05.

3. RESULTADOS

Atividade antibacteriana de PgTeL em lesões cutâneas infectadas por *S. aureus*.

O tratamento tópico com a PgTeL resultou em redução significativa do número de bactérias na lesão quando comparado ao controle infectado e tratado com NaCl 0,15 M (Figura 1A e 1B). A administração de PgTeL nas concentrações de 25 e 100 µg/mL durante 3 dias resultou em uma diminuição da carga bacteriana em cerca de 21 e 23%, respectivamente, enquanto efeito antibacteriano mais eficiente foi detectado após 10 dias de tratamento, com uma redução de até 57% na carga bacteriana quando comparado com o controle infectado. O número de colônias bacterianas nas feridas tratadas com as duas concentrações de PgTeL foi similar àquele das feridas não infectadas (Figura 1A e 1B). Portanto, os dados

revelam que a atividade antibacteriana de PgTeL contra *S. aureus* determinada anteriormente *in vitro* foi também eficiente em um modelo *in vivo*.

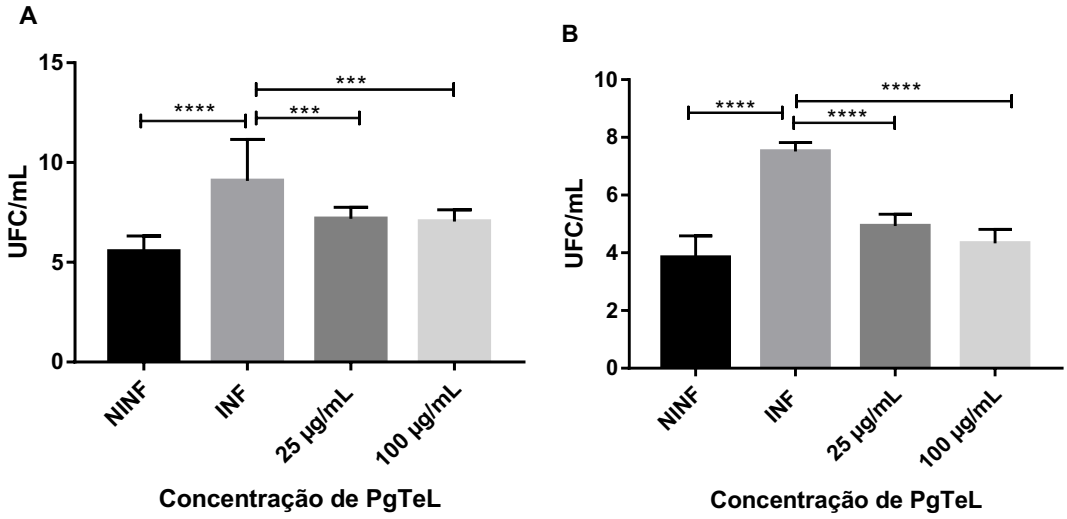


Figura 01. Efeito do tratamento tópico com PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL) na carga bacteriana das feridas contaminadas por *Staphylococcus aureus* após 3 (A) e 10 dias (B) de tratamento. NINF e INF, ferida não infectada e infectada tratada com NaCl 0.15 M, respectivamente. A carga bacteriana é expressa em x10⁶ UFC/mL. *** Diferenças estatisticamente significativas (p0.0001).

Área da Lesão

As lesões cutâneas infectadas por *S. aureus* e tratadas com PgTeL apresentaram uma redução da área da lesão mais acelerada quando comparados aos grupos controles infectado e não infectado tratados com PBS (Figura 2).

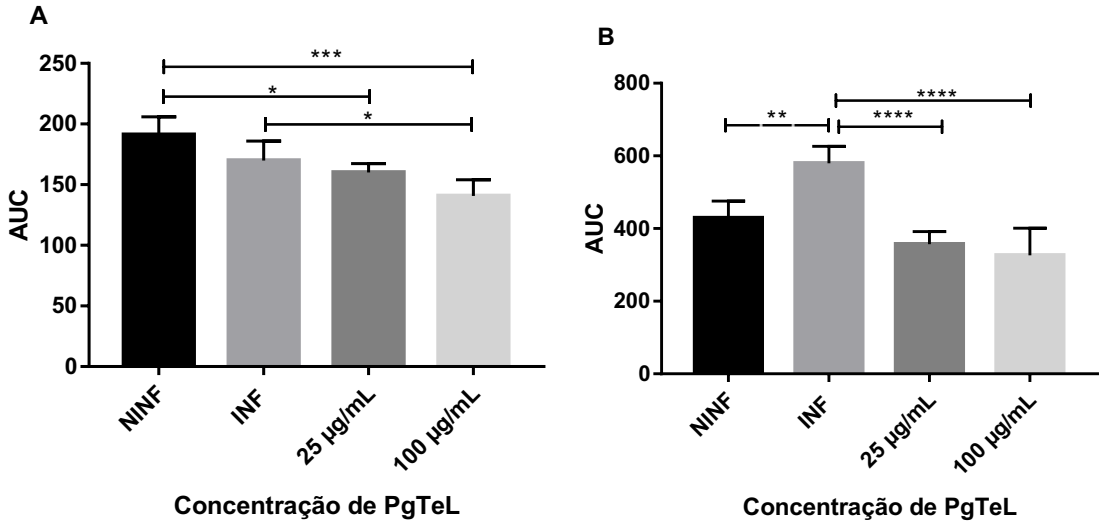


Figura 02. Efeito do tratamento tópico com PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL) na área da lesão cutânea contaminada por uma amostra clínica de *Staphylococcus aureus* após 3 (A) e 10 (B) dias de tratamento. NINF e INF, ferida não infectada e infectada tratada com NaCl 0.15 M, respectivamente. Área expressa em porcentagem (%), onde a área da lesão no dia 01 representa 100%. Em cada, valores com diferenças estatísticas entre os grupos são indicados por * ($p < 0.05$).

Após 3 dias de aplicação tópica percebeu-se que PgTeL estimulou significativamente a contração das lesões infectadas, em comparação aos animais tratados com PBS a lectina na concentração de 25 µg/mL estimulou uma redução de 7% na área da lesão, por outro lado o aumento da concentração de PgTeL aumentou esse percentual para 17,1 % (Figura 2A). Já após 10 dias de tratamento o grupo infectado apresentou diferença estatística significante em relação aos grupos tratados com PgTeL nas concentrações de 25 µg/mL e 100 µg/mL com ($p > 0.05$) (Figura 2B).

Em comparação com os grupos infectados, os grupos tratados com PgTeL obtiveram resultados significantes com 10 dias de tratamento, onde as concentrações de 25 µg/mL e 100 µg/mL, obtiveram níveis de diminuição da lesão de 39 e 44%, respectivamente, quando comparados ao controle infectado. Quando comparado ao controle não infectado, a redução nas concentrações de 25 µg/mL e 100 µg/mL foi de 16,7 e 24 %, respectivamente.

Severidade da Lesão

Na avaliação dos parâmetros inflamatórios da lesão, foi possível observar uma maior redução dos graus de níveis inflamatórios nos grupos tratados com 25 µg/mL e 100 µg/mL de PgTeL durante 10 dias (Figura 3A) em comparação aos controles tratados com PBS. Foi observado também que após 6 dias de tratamento com a PgTeL as lesões já se apresentavam sem edema, exsudato e com tecido granulado. Em contrapartida, no grupo infectado e naquele tratado apenas com PBS foi possível observar diminuição mais lenta de exsudato, edema e mudanças no aspecto tecidual.

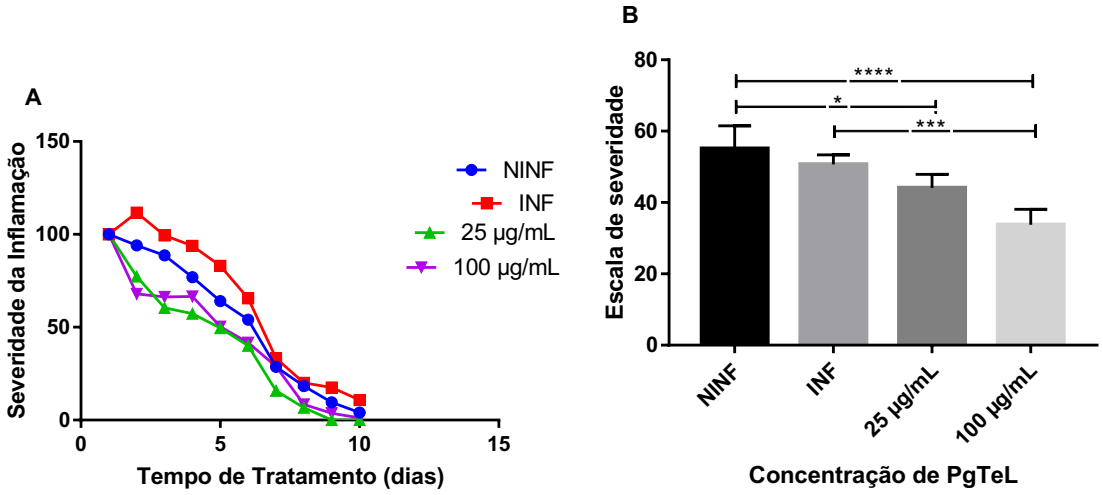


Figura 03: Efeito do tratamento tópico com a PgTeL (25 e 100 µg/mL) na severidade da inflamação nos animais submetidos à lesão cutânea contaminada por *Staphylococcus aureus*. NINF e INF, ferida não infectada e infectada tratada com NaCl 01,5 M, respectivamente. (A) Análise dos parâmetros clínicos dos grupos experimentais durante o período de 10 dias. (B) Escala de severidade dos parâmetros clínicos dos animais estudados. Diferenças estatisticamente significativas são indicados por * ($p < 0.05$).

O efeito benéfico da lectina na redução da severidade da lesão também pode ser observado no gráfico da área sobre a curva (Figura 3B), desde que o grupo infectado tratado com PBS 0,01 M apresentou média de 579,75 enquanto a média dos animais tratados com PgTeL 25 µg/mL e 100 µg/mL foi 357,2 e 326,5, respectivamente. Foi observado também que os grupos tratados com PgTeL

apresentaram diferença estatística significante em relação ao controle infectado ($p < 0.05$).

Análise Macroscópica

Na análise macroscópica realizada durante todos os dias de tratamento pode-se observar que do primeiro ao terceiro dia, as lesões ainda apresentavam sinais bem acentuados de inflamação nos grupos controles que foram infectados com *S. aureus* com a presença de exsudato e edema moderado (Figura 4 A e B). Redução dos sinais inflamatórios foi detectada a partir do sétimo dia (Figura 4C), onde já se observa o início de uma granulação tecidual, característica que permaneceu até o décimo dia de tratamento (Figura 4D). O grupo não infectado por sua vez, apresentou sinais de inflamação nos primeiros dias, mas no decorrer do processo de cicatrização da lesão, a inflamação foi diminuindo e no décimo dia de tratamento, os sinais de granulação foram observados.

Nos grupos tratados com as duas concentrações de PgTeL, observou-se uma menor resposta inflamatória nos primeiros dias de tratamento. Também pode-se observar que a partir do quinto dia de tratamento as lesões já se apresentavam sem exsudato, edema e outros sinais inflamatórios e entre o oitavo e décimo dia, as lesões já apresentavam tecido totalmente recuperado.

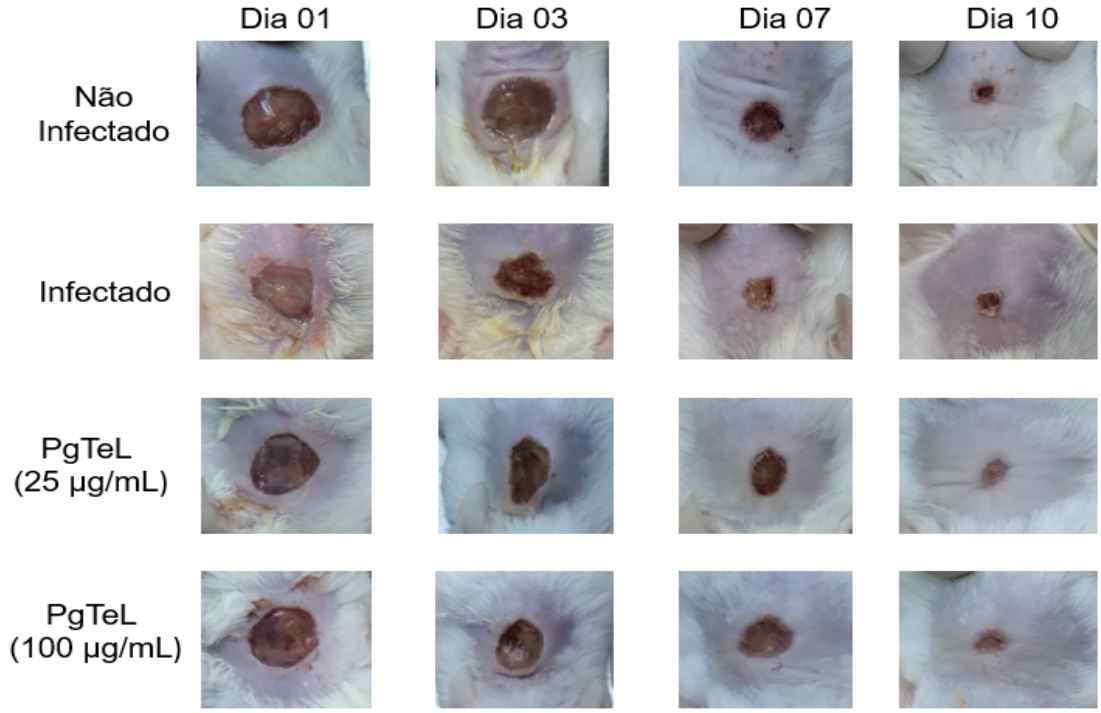


Figura 04. Análise macroscópica das lesões cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus*, não tratadas ou tratadas topicamente com PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL).

Dosagem de mediadores inflamatórios

A avaliação de citocinas presentes nos tecidos após 3 dias de tratamento com PgTeL nas concentrações de 25 e 100 µg/mL revelou a presença de citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IL-6 e MCP-1 (Figura 5). Foi detectado que não houve uma diferença significante do nível de TNF-alfa entre os grupos tratados com PgTeL e os grupos controles (Figura 5A). Os amimais não infectados tiveram um aumento das citocina MCP-1, e em contrapartida pode-se observar que o tratamento com a PgTeL nas concentrações de 25 e 100 µg/mL não alterou a produção dessa citocina durante o processo infeccioso (Figura 5B). A figura 5C mostra que não houve uma diferença significativa na produção de IL-6 entre os grupos controles e tratados com a PgTeL nas duas doses.

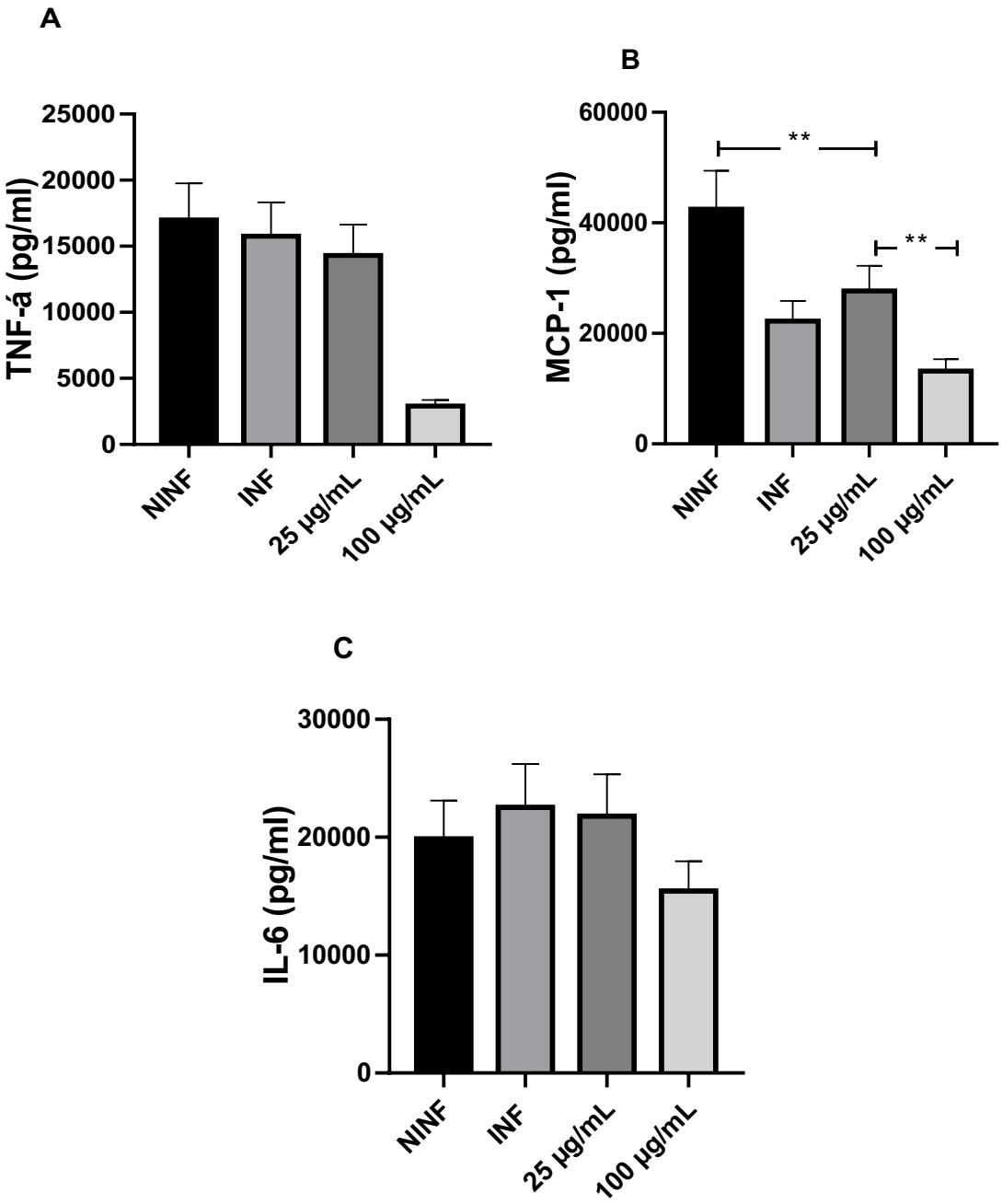


Figura 05: Efeito do tratamento tópico com PgTeL (25 e 100 µg/mL) na severidade da inflamação nos animais submetidos à lesão cutânea contaminada por *Staphylococcus aureus*. NINF e INF, ferida não infectada e infectada tratada com NaCl 01,5 M, respectivamente. Avaliação da presença (pg/mL) das citocinas TNF-alfa (A), MCP-1 (B) e MCP-1 (C). Diferenças estatisticamente significativas são indicados por * ($p < 0.05$).

Avaliação Histológica

A análise histológica dos tecidos das lesões mostrou que os animais tratados durante três dias com PgTeL nas concentrações de 25 e 100 µg/mL (Figura 6E e G) apresentaram padrões bem parecidos quanto a ausência de proliferação de fibroblastos, debris celulares, deposição de colágeno e angiogênese. Já quando comparado os níveis de infiltrado inflamatório, os grupos tratados apresentaram resultados melhores na redução da inflamação gerada pela infecção pelo *Staphylococcus aureus.* Após dez dias de tratamento com a lectina nas duas concentrações, principalmente 100 µg/mL (Figura 6F e H) já pode-se observar resultados bem satisfatórios em relação a deposição de colágeno, proliferação de fibroblastos e revitalização do tecido lesado e a ausência de infiltrado inflamatório. Após o fim do tratamento, o tecido encontrava-se integro e foi observado a presença de folículos pilosos na região afetada.

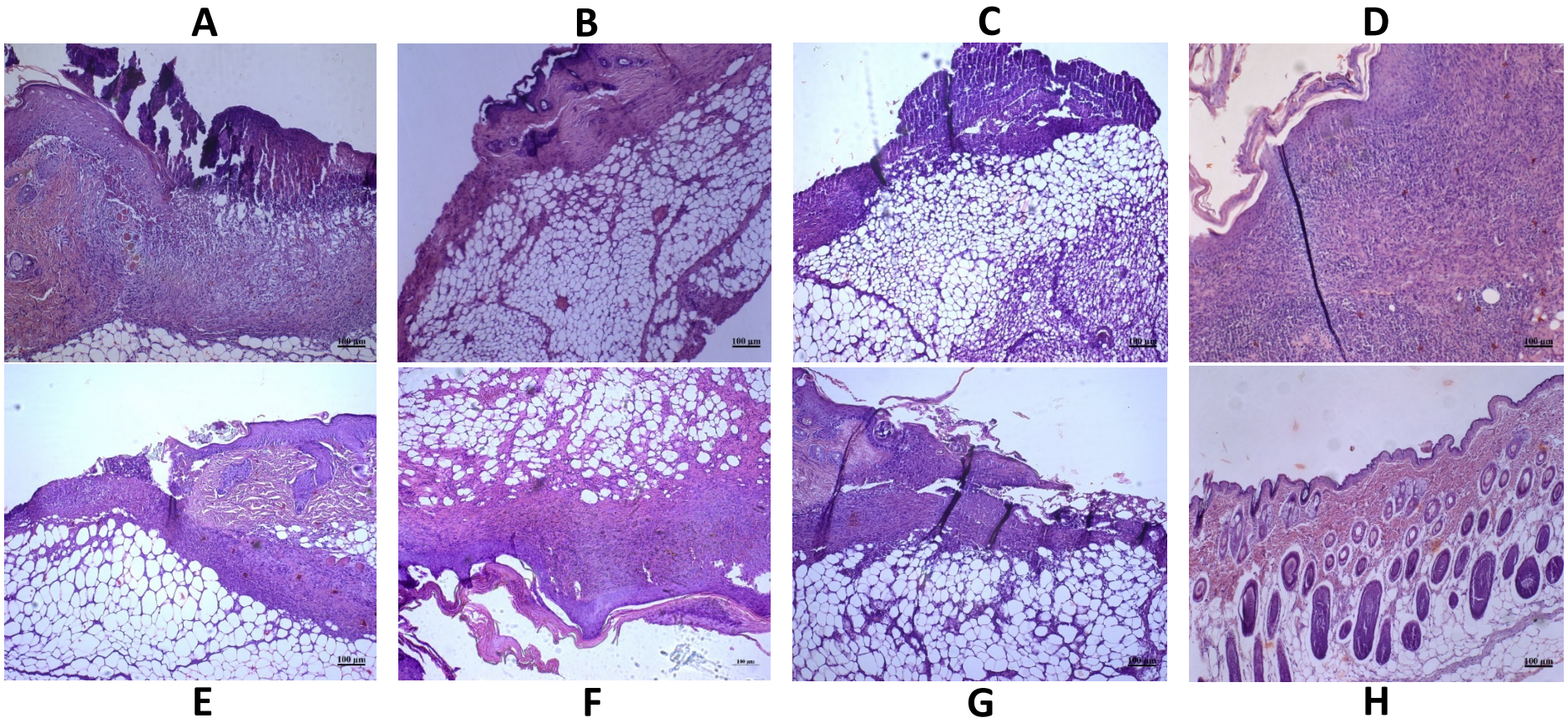


Figura 6 – Análise histopatológica do processo antimicrobiano cutâneo em camundongos (*Swiss*) com lesão induzida cirurgicamente, e infectada por *S. aureus* e tratada com PgTeL.Não infectado, 3 dias (**A**) e 10 dias (**B)**; Infectado não tratado 3 dias (**C**) e 10 dias (**D**); Infectado e tratado com PgTeL 25 µg/mL 3 dias (**E**) e 10 dias (**F**); Infectado e tratado com PgTeL 100 µg/mL, 3 dias (**G**) e 10 dias (**H**). Aumento de 10X. HE.

4 DISCUSSÃO

A busca por novos agentes antimicrobianos para uso terapêutico tem sido realizada devido ao desenvolvimento de resistência e aumento de virulência de cepas de bactérias que causam doenças no homem e em outros animais. O uso de proteínas bioativas tem sido muito estudado na busca por alternativas para sanar esse problema. Lectinas possuem atividade bacteriostática e bactericida devido à capacidade em interagir especificamente com glicoconjugados e polissacarídeos presentes na parede celular (PAIVA et al., 2010; KLAFKE et al., 2013) A atividade antibiofilme de lectina pode ser resultante de inibição da fixação da bactéria impedindo assim o quorum sensing e polimerização de EPS decorrente da ligação da proteína a polissacarídeos na parede celular bem como devida a alteração na expressão de genes relacionados à formação do biofilme (MOURA et al., 2017).

Em outro estudo in vitro, Silva et al. (2019) investigando e efeito de PgTeL contra as cepas de *S. aureus* 8325-4 (cepa derivada da NCTC 8325 não resistente a antibióticos) e LAC USA300, cepa multirresistente bastante usada em modelos de resistência a meticilina, demonstraram a atividade bacteriostática com uma CMI de 6,25 para 8325-4 e 12,5 µg/mL para LAC USA300 e bactericida com CMB 25 µg/mL para 8325-4 e 50 µg/mL para LAC USA300. Os autores também mostraram que PgTeL causou alterações estruturais nas cepas promovendo lesão e morte celular, diminuiu a capacidade de agregação e inibiu a formação de biofilme.

A detecção de atividade antibacteriana in vitro de PgTeL não assegura que ela seja um eficiente agente antibacteriano em condições fisiológicas, sendo assim necessários estudos para a sua comprovação. O estudo aqui reportado avaliou se a atividade antibacteriana de PgTeL contra *S. aureus* reduziria a infecção de ferida cutânea em animal contaminada com *S. aureus* ATCC 6538.

Lectinas com atividade antibacteriana eficiente tanto em condições in vitro como in vivo têm sido reportadas. Lima et al. (2019) utilizando o modelo de infecção com *S. aureus* em larvas de *Galleria mellonella* mostraram que a lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolia Raddi* diminuiu a carga bacteriana na hemolinfa das larvas e aumentou o tempo de sobrevida delas. A lectina in vitro,

aumentou a ação bactericida de macrófagos frente a cepas de *S. aureus* através da indução da liberação de citocinas.

Diferentemente de PgTeL, três lectinas ligadoras de manose de *Cynoglossus semilaevis* mostraram ação antibacteriana distintas em condições in vitro e in vivo (SUN et al., 2016). O estudo mostrou que as três lectinas reduziram o crescimento de *Edwardsiella tarda, Vibrio harveyi e Micrococcus luteus* in vitro, enquanto no ensaio in vivo reduziram apenas a infecção *Vibrio harveyi.*

Atividade antifúngica de lectinas em ensaios in vivo também tem sido reportada. Jandu (2019) mostraram que a lectina de semente de *Cratylia mollis* Mart in vitro aumentou a atividade fagocitária de macrófagos contra *Crytococcus gattii* e in vivo, aumentou seu a sobrevida dos animais tratados devido a diminuição da quantidade de fungos no pulmão e cérebro.

A aplicação tópica de PgTeL (25 µg/mL e 100 µg/mL) na lesão infectada por *S. aureus* mostrou uma redução da área da lesão e de sinais inflamatórios, incluindo ausência de edema e exsudato. PgTeL também foi eficiente em promover a remodelação do tecido da lesão. Diferentemente das lesões não tratadas, as lesões tratadas com a lectina já apresentavam granulação tecidual a partir do sétimo dia e tecido epitelial entre o oitavo e décimo dia.

Moutinho (2007) mostrou atividade cicatrizante de lectina isolada de sementes de *Cratylia mollis* usando animais imunossuprimidos. A lectina na dose de 10 µg/mL, diminuiu parâmetros inflamatórios como edema e hiperemia e promoveu regressão da área da lesão, formação crosta e surgimento de tecido de granulação cicatricial.

Atividade *in vitro* e in vivo também foi detectada em extrato da casca da romã (FERNANDES, 2017). Os autores mostraram que o extrato, na concentração de 391 µg/mL, teve uma atividade antibacteriana contra *S. aureus* in vitro e in vivo, reduzindo a inflamação e promovendo cicatrização.

Outra característica que deve ser levada em consideração é a atividade imunomoduladora de lectinas, desde que citocinas estão envolvidas em processos de cicatrização de feridas. A redução dos níveis de inflamação nos grupos tratados com PgTeL, pode ser devida não apenas a sua ação antibacteriana já comprovada em testes *in vitro*, mas também por não ter sido

detectado aumento de citocinas pró-inflamatórias após o tratamento com a lectina. Coroliano et al. (2018) demonstraram que a lectina solúvel em água de *Moringa oleifera* induziu a liberação das citocinas TNF-α, IL-2, IL-6, IL-10 em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) e ativou linfócitos T CD8 +.

5 CONCLUSÃO

O estudo revelou que a lectina da sarcotesta da *Punica granatum* (PgTeL), *in vivo*, foi antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, devido reduzir o número de bactérias viáveis no tecido lesionado, diminuindo a inflamação e acelerando a regeneração do tecido com consequente diminuição da área da lesão.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo a administração tópica das duas concentrações testadas de PgTeL reduziu a viabilidade de *S. aureus* na lesão logo após os três primeiros dias de tratamento e, portanto, os dados obtidos revelam que a atividade antibacteriana de PgTeL contra *S. aureus* foi também eficiente em um modelo in vivo.

REFERÊNCIAS

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.

BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (Punica granatum) leaves. Food and Chemical Toxicology, v. 55, p. 470-475, 2013.

BELTRAMINI, Leila Maria et al. Estudos estruturais e correlações com a função biológica entre formas nativas, desnaturada e reenoveladas, investigadas por métodos espectroscópicos, proteínas de interesse biotecnológico. 2017.

CORIOLANO, Marilia C. et al. Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Protein and peptide letters**, v. 25, n. 3, p. 295-301, 2018.

DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. International journal of biological macromolecules, v. 108, p. 391-400, 2018.

DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.

DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of Staphylococcus aureus clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019.

DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β-lactamase-producing Escherichia coli. **International journal of biological macromolecules**, v. 135, p. 931-939, 2019.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

EL-KASED, Reham F. et al. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

FERNANDES, Renan Aparecido et al. Fitossíntese de nanopartículas de prata a partir de extrato de cascas de romã e desenvolvimento de formulação para tratamento de feridas: avaliação antimicrobiana, citotóxica e potencial cicatrizante em um modelo in vivo. 2017.

FERREIRA, Gustavo Ramos Salles et al. Potencial antimicrobiano da lectina de Alpinia purpurata (ApuL): Ação inibitória do crescimento, efeitos sinérgicos em combinação com antibióticos e atividade antibiofilme. **Patogênese microbiana** , v. 124, p. 152-162, 2018.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from S chinus terebinthifolius leaf. Journal of applied microbiology, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GREEN, A. A., HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. 1955.

HAGHAYEGHI, K., SHETTY, K., & LABBÉ, R. Inhibition of foodborne pathogens by pomegranate juice. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 5, p. 467-470, 2013.

HUMPHREYS, Hilary. Staphylococcus aureus: o patógeno duradouro em cirurgia. **o cirurgião** , v. 10, n. 6, pág. 357-360, 2012.

JANDÚ, Jannyson JB et al. Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 671, 2017.

JANDÚ, Jannyson José Braz. O uso de pCramoll como tratamento da criptococose em camundongos imunocompetentes e imunossurimidos. 2019.

Klafke, GB, Borsuk, S., Gonçales, RA, Arruda, FVS, Carneiro, VA, Teixeira, EH, ... & Pinto, LS (2013). Inibição da adesão inicial de bactérias orais por meio de

uma lectina de B auhinia variegata L. var. variegata expressa em E scherichia coli. *Journal of* application *microbiology* , *115* (5), 1222-1230.

LEGUA, P., FORNER-GINER, M. Á., NUNCIO-JÁUREGUI, N., & HERNÁNDEZ, F. Polyphenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of nineteen pomegranate fruits: A rich source of bioactive compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 628-636, 2016.

LIMA, Isana Maria de Souza Feitosa et al. Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of Staphylococcus aureus-infected macrophages. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MOSTAFA, Ashraf A. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 25, n. 2, p. 361-366, 2018.

MOURA, M. C. et al. 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.

MOUTINHO LAGOS DE MELO, Cristiane. **Avaliação da atividade cicatrizante da Lectina de Cratylia mollis em camundongos normais e imunodeprimidos experimentalmente**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

OLIVEIRA, Diana; BORGES, Anabela; SIMÕES, Manuel. Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

ORTINES, R. V., LIU, H., CHENG, L. I., COHEN, T. S., LAWLOR, H., GAMI, A., ASHBAUGH, A. G. Neutralizing α-toxin accelerates healing of Staphylococcus aureus-infected wounds in normal and diabetic mice. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. AAC. 02288-17, 2018.

Paiva, PMG , Gomes, FS , Napoleão, TH , Sá, RA , Correia, MTS e Coelho, LCBB (2010) Atividade antimicrobiana de metabólitos secundários e lectinas de plantas . Em *Tópicos Atuais de Pesquisa, Tecnologia e Educação em Microbiologia Aplicada e Biotecnologia Microbiana* ed. A. Méndez-Vilas pp. 396 - 406 . Badajoz : Centro de Pesquisa Formatex.

PROCÓPIO, Thamara F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. Antibacterials: synthesis, properties and biological activities. New York: Nova Sci Pub, p. 69-90, 2017.

SANTOS, Valdenice F. et al. The Galactose-Binding lectin isolated from Vatairea macrocarpa seeds enhances the effect of antibiotics against Staphylococcus aureus–resistant strain. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, n. 1, p. 82-90, 2020.

SILVA, J. A. T., RANA, T. S., NARZARY, D., VERMA, N., MESHRAM, D. T., & RANADE, S. A. Pomegranate biology and biotechnology: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 85-107, 2013.

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

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

SUN, Yuan-yuan et al. Three novel B-type mannose-specific lectins of Cynoglossus semilaevis possess varied antibacterial activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 194-202, 2016.

TONG, Steven YC et al. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical microbiology reviews, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

REFERÊNCIAS

ADAMUDE, Fatima Amin et al. Identification and characterization of lectin gene isolated from an indigenous Albizia lebbeck seeds. Scientific African, v. 7, p. e00234, 2020.

AL-MUAMMAR, M.N., FOZIA. KHAN, F. 2012. Obesity: the preventive role of the pomegranate (Punica granatum). Nutrition 29, 595-604.

APG II. The Angiosperm Phylogenetic Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society 141 (4): 399-436, 2003.

ARASU, Abirami et al. Bacterial membrane binding and pore formation abilities of carbohydrate recognition domain of fish lectin. Developmental & Comparative Immunology, v. 67, p. 202-212, 2017.

ARUN, N.; SINGH, D.P. Punica granatu: A review on pharmacological and therapeutic properties. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. V.3. p.1240-1245, 2012.

ATHAMNA, Abed et al. Rapid identification of Mycobacterium species by lectin agglutination. Journal of microbiological methods, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.

BARBER, Mary et al. Infection by Penicillin-Resistant Staphyloeoeci. **Lancet**, p. 641-4, 1948.

BEHZADI, Shahrbabaki, H. (1998). Diversidade genética de genótipos de romã no Irã. *Nashr Amoozesh Keshavarzi* , 265.

BEKIR et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and citotoxy activies of pomegranate (Punica granatum) leaves, Food and Chemical Toxicology 55 (2013). 470-475.

BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (Punica granatum) leaves. Food and Chemical Toxicology, v. 55, p. 470-475, 2013.

BEKIR, Jalila et al. In vitro anti-cholinesterase and anti-hyperglycemic activities of flowers extracts from seven pomegranate varieties. Industrial Crops and Products, v. 81, p. 176-179, 2016.

BHASKAR, Anusha; KUMAR, Anish. Antihyperglycemic, antioxidant and hypolipidemic effect of Punica granatum L flower extract in streptozotocin induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, n. 3, p. S1764-S1769, 2012.

BIES, Christiane; LEHR, Claus-Michael; WOODLEY, John F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Advanced drug delivery reviews, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.

BONNARDEL, Francois et al. Structural Database for Lectins and the UniLectin Web Platform. Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ), v. 2132, p. 1-14, 2020.

BOUCHER HW, Corey GR. Epidemiologia de Staphylococcus aureus resistente à meticilina. Clin Infect Dis. 01 de junho de 2008; 46 Suplemento 5 : S344-9.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 1976, 72.1-2: 248-254.

BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. Journal of applied microbiology, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

BUSSMANN, Rainer W. et al. Punica granatum L. Lythraceae. **Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe: Ural, Northern Caucasus, Turkey, and Iran**, p. 1-6, 2020.

CARVALHO, A. D. S. (2013). Purificação e caracterização de lectinas em sementes de Apuleia leio carpa (VOGEL) JF Macbride (FABACEAE): Potencial Antimicrobiano (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).

CARVALHO, E. V. M. M. et al. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. Life sciences, 2018.

COELHO, J. S. et al. Effect of Moringa oleifera lectin on development and mortality of Aedes aegypti larvae. Chemosphere, v.77, p. 934-938, 2009.

COELHO, L. C. B. B. et al. Protein purification by affinity chromatography. In: Ahmad, R. (ed.) Protein Purification, Rijeka: InTech, p. 53-72, 2012.

COELHO, L. C. B. B et al .Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, 2017.

COLLADO ROSAS, Claudia Rosa. Aislamiento y Caracterización bioquímica de proteínas citotóxicas (Lectinas) de Semillas de Cucurbita maxima “zapallo”. 2019.

CONNOLLY, Roisin et al. Would hemodialysis patients benefit from a Staphylococcus aureus vaccine?. Kidney International, 2019.

CORREIA, M. T. S. et al. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). Recent Trends in Toxicology. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). Recent Trends in Toxicology. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena et al. ANALISE PRELIMINAR QUALITATIVA FITOQUÍMICA E DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE CASCA DE Bertholletia excelsa HUMB. & BOMPLE (LECYTHIDACEAE) FRENTE A MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVO. **Ciência Equatorial**, v. 2, n. 1, 2012.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DA SILVA, Luís Cláudio Nascimento, et al. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with Staphylococcus aureus. *International journal of biological macromolecules*, 2015, 72: 848-854.

DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. International journal of biological macromolecules, v. 108, p. 391-400, 2018.

ELFALLEH, Walid et al. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. Journal of Medicinal Plants Research, v. 6, n. 32, p. 4724-4730, 2012.

FERNANDES, Prabhavathi; MARTENS, Evan. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 152-163, 2017.

FERREIRA, R. S. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from Moringa oleifera. Letters in applied microbiology, v. 53, n. 2, p. 186-192, 2011.

GABIUS, H. J.; Nom carbohydrate binding partners, domains of animal lectins. International Journal Biochemistry. v. 26, p. 469-477, 1994.

GABOR, F. et al. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. v. 56, n.4, p. 459-480, 2004.

GAO, Jingqing; LIU, Dianjun; WANG, Zhenxin. Screening lectin-binding specificity of bacterium by lectin microarray with gold nanoparticle probes. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 22, p. 9240-9247, 2010.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from S chinus terebinthifolius leaf. Journal of applied microbiology, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from S chinus terebinthifolius leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

GOMES, F. S. et al. Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. Advances in Research, v. 2, p. 250-265, 2014.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAABER, Jakob et al. Reversible antibiotic tolerance induced in Staphylococcus aureus by concurrent drug exposure. **MBio**, v. 6, n. 1, 2015.

HAGHAYEGHI, K., SHETTY, K., & LABBÉ, R. Inhibition of foodborne pathogens by pomegranate juice. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 5, p. 467-470, 2013.

HARTMAN, Richard E. et al. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiology of disease, v. 24, n. 3, p. 506-515, 2006.

HOLLAND, D. et al. Pomegranate: botany, horticulture, breeding. Horticultural reviews, v. 35, n. 2, p. 127-191, 2009.

HOWDEN, Benjamin P. et al. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3039-3047, 2006

JONES, Tyler H. et al. Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. Frontiers in microbiology, v. 8, p. 755, 2017.

JUAN, Laura Lavín et al. Pharmaceutical applications of lectins. Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 42, p. 126-133, 2017.

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

LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. Applied microbiology and biotechnology, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LEGUA, P., FORNER-GINER, M. Á., NUNCIO-JÁUREGUI, N., & HERNÁNDEZ, F. Polyphenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of nineteen pomegranate fruits: A rich source of bioactive compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 628-636, 2016.

LIS, Halina; SHARON, Nathan. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chemical reviews, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LOPES, K. L. et al. Comportamento de sementes de romã (Punica granatum L.) submetidas à fermentação e secagem. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 369-372, 2001

LOREN, DJ, Seeram, NP, Schulman, RN, e Holtzman, DM (2005). A suplementação dietética materna com suco de romã é neuroprotetora em um modelo animal de lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal. Pediatr. Res. 57, 858–864.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. Nova, 2001.

LOWRY, Oliver H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, 1951, 193: 265-275.

Lowy FD. Infecções por Staphylococcus aureus. N Engl J Med. 20 de agosto de 1998; 339 (8): 520-32.

LUCCI, P. et al. Punica granatum cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: Antioxidant and antiproliferative activities. Food chemistry, v. 167, p. 475-483, 2015.

MCGUINNESS, W. A. et al. “Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*.” *The Yale journal of biology and medicine* vol. 90,2 269-281. 23 Jun.2017.

MEDEIROS, Danielle S. et al. A lactose specific lectin from the sponge Cinachyrella apion: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on Leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MEIRELES, M. A. O. M. Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico [dissertation]. **Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas**, 2008.

MISHRA, Abtar et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. Food and Chemical Toxicology, v. 134, p. 110827, 2019.

MOSTAFA, Ashraf A. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 25, n. 2, p. 361-366, 2018.

MOURA, M. C. et al. 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.

MUKHERJEE, Sohini et al. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. Nature, v. 505, n. 7481, p. 103-107, 2014.

NAPOLEÃO, T. H. et al. "Affinity Matrices of Cratylia mollis Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures." Applied biochemistry and biotechnology. 171.3, 744-755, 2013.

OGSTON, Alexander. Classics in infectious diseases.“On abscesses”. **Rev Infect Dis**, v. 6, n. 1, p. 122-128, 1984.

OLSEN, John Elmerdahl; CHRISTENSEN, Henrik; AARESTRUP, Frank Møller. Diversity and evolution of blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450-460, 2006.

PAGLIARULO, Caterina et al. Inhibitory effect of pomegranate (Punica granatum L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Food chemistry, v. 190, p. 824-831, 2016.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, v. 1, p. 396-406, 2010.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, v. 1, n. 2, p. 396-406, 2010.

PAIVA, P.M.G. et al. Plant Compounds With Aedes Aegyptin Larvicidal Activity And Other Biological Properties. In: LIONG, M. (Ed.), Bioprocess Sciences and Technology. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 271-296, 2011.

PAJIC, Ivana, et al. A novel lectin from the sponge Haliclona cratera: isolation, characterization and biological activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2002, 132.2: 213-221.

PANTH, Nisha; MANANDHAR, Bikash; PAUDEL, Keshav Raj. Anticancer activity of Punica granatum (pomegranate): a review. Phytotherapy Research, v. 31, n. 4, p. 568-578, 2017.

PEUMANS, Willy J.; DAMME, Els JM Van. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998.

PROCOPIO, T. F., Moura, M. C., Albuquerque, L. P., Gomes, F. S., Santos, N. D. L., Coelho, L. C. B. B., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G. et al. (2017a) Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. In Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities ed. Collins, E., 1st edn, pp. 69–89. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc.

PROCÓPIO, Thamara F. et al. Lectinas antibacterianas: mecanismos de ação, papéis defensivos e potencial biotecnológico. **Antibacterianos: síntese, propriedades e atividades biológicas. Nova York: Nova Sci Pub** , p. 69-90, 2017.

RAJA, Subramaniya Bharathi et al. Isolation and partial characterisation of a novel lectin from Aegle marmelos fruit and its effect on adherence and invasion of Shigellae to HT29 cells. **PloS one**, v. 6, n. 1, 2011.

RAMMELKAMP, Charles H.; MAXON, Thelma. Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 386-389, 1942.

Rasigade JP, Vandenesch F. Staphylococcus aureus: um patógeno com questões ainda não resolvidas. Infect Genet Evol. Janeiro de 2014; 21 : 510-4.

RICE, Louis B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. 2008.

ROCH, Mélanie et al. Exposure of Staphylococcus aureus to subinhibitory concentrations of β-lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5306-5314, 2014.

ROSAS-BURGOS, Ema C. et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 97, n. 3, p. 802-810, 2017.

SANTOS, Andrea FS, et al. Isolation of a seed coagulant Moringa oleifera lectin. *Process biochemistry*, 2009, 44.4: 504-508.

SANTOS, Elizeu Pereira et al. Punica Granatum L.(Romã) e Atividade Antimicrobiana Contra o Biofilme Dental: uma Revisão Bibliográfica. Ensaios e Ciência, v. 23, n. 2, p. 88-93, 2019.

SHARMA, A.; THAKUR, N. S. Influence of active packaging on quality attributes of dried wild pomegranate (Punica granatum L.) arils during storage. Journal of Applied and Natural Science, v. 8, n. 1, p. 398-404, 2016.

SHAYGANNIA, Erfaneh et al. A review study on Punica granatum L. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine, v. 21, n. 3, p. 221-227, 2016.

SILVA, J. A. T., RANA, T. S., NARZARY, D., VERMA, N., MESHRAM, D. T., & RANADE, S. A. Pomegranate biology and biotechnology: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 85-107, 2013.

SILVA, P. M. D. (2019). Potencial antimicrobiano da lectina da sarcotesta de Punica granatum (PgTeL) contra patógenos humanos.

SILVA, P. M., et al. Antibacterial effects of the lectin from pomegranate sarcotesta (PgTeL) against *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, 2020.

SOUZA, Jayra D., et al. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and

termiticidal activities. International biodeterioration & biodegradation, 2011, 65.5: 696-702.

SUN, Yuan-yuan et al. Three novel B-type mannose-specific lectins of Cynoglossus semilaevis possess varied antibacterial activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Developmental & Comparative Immunology, v. 55, p. 194-202, 2016.

SURETTE, Matthew D.; WRIGHT, Gerard D. Lessons from the environmental antibiotic resistome. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 309-329, 2017.

TANG, Yuanyue et al. Methicillin-resistant and-susceptible Staphylococcus aureus from retail meat in Denmark. International journal of food microbiology, v. 249, p. 72-76, 2017.

VAN DAMME, Els JM et al. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. John Wiley & Sons, 1998.

VAN DAMME, Els JM et al. Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (Sambucus nigra) bark. Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 13, p. 8353-8360, 1997.

VELAYUTHAM, Veeramani et al. Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, Oryctes rhinoceros. Process Biochemistry, v. 53, p. 232-244, 2017.

VIERA, Gustavo Hitzschky Fernandes et al. Efeito antibacteriano (in vitro) de Moringa oleifera (moringa) e Annona muricata (graviola) frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positiva. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129-132, 2010.

WINTER, Harry C.; MOSTAFAPOUR, Kazem; GOLDSTEIN, Irwin J. The mushroom Marasmius oreades lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Galα1, 3Gal and Galα1, 3Galβ1, 4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 17, p. 14996-15001, 2002.

WOHLSCHLAGER, Therese et al. Methylated glycans as conserved targets of animal and fungal innate defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. E2787-E2796, 2014.

ZANETTI, G. D. Lectina dos rizomas de Arundo donax L.: Purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas. Tese (Doutorado em Biociências). Instituto de Biociências. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007

ZHOU, Ze-jun; SUN, Li. CsCTL1, a teleost C-type lectin that promotes antibacterial and antiviral immune defense in a manner that depends on the conserved EPN motif. Developmental & Comparative Immunology, v. 50, n. 2, p. 69-77, 2015.