

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

GUSTAVO RAMOS SALLES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
LECTINA DA INFLORESCÊNCIA DE *Alpinia purpurata* (ApuL)**

Recife

2018

GUSTAVO RAMOS SALLES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
LECTINA DA INFLORESCÊNCIA DE *Alpinia purpurata* (ApuL)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Ciências
Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Coorientadora: Dr^a. Maiara Celine de Moura

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ferreira, Gustavo Ramos Salles

Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme da lectina da inflorescência de *Alpinia purpurata* (ApuL) / Gustavo Ramos Salles Ferreira - 2018.

71 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Maiara Celine de Moura

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Resistência microbiana 2. Biofilme 3. Sinergismo
I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Moura, Maiara Celine de (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-042

GUSTAVO RAMOS SALLES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
LECTINA DA INFLORESCÊNCIA DE *Alpinia purpurata* (ApuL)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 20/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Membro Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico essa dissertação a Deus, aos meus pais,
Severino e Janice, e à minha namorada
Rebeca.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, pela saúde e pelas oportunidades.

Aos meus pais, Severino e Janice, por tudo que fizeram por mim, por me fazer sempre seguir em frente e ser quem eu sou hoje.

Aos meus queridos avós Helena e Carlos, por todo amor, carinho e apoio em todos esses anos.

Aos meus padrinhos Uiara e Vildson, por toda força e apoio que sempre me deram.

Ao meu orientador professor Thiago, pela imensa oportunidade que me foi dada, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela amizade.

A Maiara, minha coorientadora e amiga, pelos ensinamentos, pelo apoio, por querer sempre o melhor de mim e sempre acreditar no meu potencial.

A Jéssica, pela amizade, pela parceria, e por todo o apoio no desenvolvimento desse projeto.

Às minhas queridas amigas Amanda, Ana Luiza e Walquiria, por toda amizade, força, companheirismo e incentivo que me dão sempre desde a época do colégio.

À minha namorada Rebeca, pelo amor, pelo carinho, pela força, por me fazer sempre querer ser o melhor de mim.

Ao meu querido afilhado Pedro, por me ensinar responsabilidade, pelo amor e pelo carinho.

Aos amigos da UFPE Leydianne, Wiviane, Leandro, Caio, Larissa, Luanna, Mário, Victor e Raquel, pelas brincadeiras, pelo apoio e pela amizade nesses anos de faculdade.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Nataly, Carlos, Dayvid, Lívia, Leonardo, Bernardo, Robson, Thamara, Pollyanna, Emmanuel, Poliana e todos os demais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Mestrado.

Ao CNPq, à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para execução desse trabalho.

*“O conhecimento torna a alma jovem e
diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a
sabedoria. Armazena suavidade para o
amanhã.”*

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O crescente número de infecções bacterianas e fúngicas, principalmente causadas por espécies resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis, constitui uma ameaça à saúde pública mundialmente. A capacidade dos microrganismos em formar biofilme, estilo de vida associado com diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, é motivo de preocupação principalmente em ambientes hospitalares. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e exibem diversas atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana. Uma lectina denominada ApuL foi isolada das brácteas da inflorescência de *Alpinia purpurata*, uma planta ornamental da família Zingiberaceae. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de ApuL contra microrganismos patogênicos não-resistentes e resistentes a fármacos atualmente utilizados. ApuL apresentou atividade bacteriostática contra isolados não-resistente (ATCC 6583) e resistente à oxacilina (UFPEDA-672) de *Staphylococcus aureus* com valores de concentração mínima inibitória (CMI) de 50 e 400 µg/mL, respectivamente. Ação bactericida foi detectada somente para o isolado não-resistente (concentração mínima bactericida: 200 µg/mL). A combinação ApuL-oxacilina apresentou efeitos sinérgicos sobre dois isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina (UFPEDA-670 e 671), que não foram sensíveis à lectina isoladamente. Análise de curvas de crescimento, extravasamento de proteínas e alterações ultraestruturais (por microscopia de varredura) demonstraram que ApuL atua através de mecanismos distintos sobre os isolados de *S. aureus*. ApuL não apresentou ação antibacteriana contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, porém efeito sinérgico foi observado para a combinação ApuL-ceftazidima contra um isolado multirresistente dessa espécie. Para *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, ApuL apresentou ação fungistática (CMI: 200 e 400 µg/mL, respectivamente) e fungicida (concentração mínima fungicida: 400 µg/mL para ambas as espécies). A ação sinérgica da combinação ApuL-fluconazol foi detectada contra *C. parapsilosis*, que foi insensível a esse fármaco isoladamente. A análise ultraestrutural das células de *Candida* tratadas com ApuL revelou malformações com alongamentos e protuberâncias. A formação de biofilme pelo isolado não-resistente de *S. aureus* e por *C. albicans* foi reduzida em aproximadamente 50% e 25%, respectivamente, por ApuL em concentrações sub-inibitórias. Por outro lado, efeito antibiofilme fraco foi observado contra *C. parapsilosis* e não foi detectado para o isolado *S. aureus* UFPEDA-672. Em conclusão, ApuL apresentou efeitos diferenciais sobre isolados bacterianos não-resistentes e resistentes a antibióticos, foi ativa contra espécies de *Candida* e apresentou ação sinérgica em combinação com antibióticos.

Palavras-chave: Resistência microbiana. Biofilme. Sinergismo. Lectina. Antibiótico.

ABSTRACT

The increasing number of bacterial and fungal infections, mainly caused by species resistant to the available antimicrobial agents, constitutes a threat to world public health. The ability of microorganisms to form biofilm, a lifestyle associated with different mechanisms of antimicrobial resistance, is concerning mainly in hospital environments. Lectins are proteins that bind to carbohydrates and exhibit various biological activities, including antimicrobial action. A lectin named ApuL was isolated from the bracts of the inflorescence of *Alpinia purpurata*, an ornamental plant of Zingiberaceae family. The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial action of ApuL against pathogenic microorganisms that are non-resistant and resistant to drugs currently used. ApuL demonstrated bacteriostatic activity against non-resistant (ATCC 6583) and oxacillin-resistant (UFPEDA-672) isolates of *Staphylococcus aureus* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 50 and 400 µg/mL, respectively. Bactericidal action was detected only for the non-resistant isolate (minimum bactericidal concentration: 200 µg/mL). ApuL-oxacillin combination showed synergistic effects on two isolates of oxacillin-resistant *S. aureus* (UFPEDA-670 and 671), which were not susceptible to lectin alone. Analysis of growth curves, protein leakage, and ultrastructural changes (by scanning microscopy) showed that ApuL acts through distinct mechanisms on *S. aureus* isolates. ApuL showed no antibacterial action against *Pseudomonas aeruginosa* isolates, but synergistic effect was observed for the ApuL-ceftazidime combination against a multiresistant isolate of this species. For *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, ApuL presented fungistatic (MIC: 200 and 400 µg/mL, respectively) and fungicide (minimum fungicidal concentration: 400 µg/mL for both species) actions. The synergistic action of the combination ApuL-fluconazole was detected against *C. parapsilosis*, which was insensitive to this drug alone. Ultrastructural analysis of *Candida* cells treated with ApuL revealed malformations with elongations and bulges. Biofilm formation by the non-resistant isolate of *S. aureus* and *C. albicans* was reduced in approximately 50% and 25%, respectively, by ApuL at subinhibitory concentrations. On the other hand, weak antibiofilm effect was observed against *C. parapsilosis* and was not detected for *S. aureus* UFPEDA-672. In conclusion, ApuL presented differential effects on non-resistant and antibiotic-resistant bacterial isolates, was active against *Candida* species and presented synergistic action in combination with antibiotics.

Key-words: Microbial resistance. Biofilm. Synergism. Lectin. Antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 - Estágios de formação de um biofilme.....	21
Figura 2 - Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 3 – Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Figura 4 – Inflorescência de <i>Alpinia purpurata</i> (A) e <i>Alpinia purpurata</i> (B)..	31

ARTIGO

Figura 1 - Growth curves (6 h incubation) and protein leakage (insets) from cells of <i>Staphylococcus aureus</i> non-resistant isolate ATCC-6538 (A) and oxacillin-resistant isolate UFPEDA-672 (B) as well as of the yeasts <i>Candida albicans</i> (C) and <i>Candida parapsilosis</i> (D), in the absence (negative control) and presence of <i>Alpinia purpurata</i> inflorescence lectin (ApuL). Leakage of proteins was evaluated after 24 h of incubation. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments in triplicate. (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$).....	54
Figura 2 - Scanning electron microscopy of microbial cells after exposure to ApuL at the MIC ₅₀ . Control (a, c, e, g) and ApuL-treated (b, d, f, h) cells of <i>Staphylococcus aureus</i> non-resistant isolate (a, b), <i>Staphylococcus aureus</i> oxacillin-resistant isolate UFPEDA-672 (c, d), <i>Candida albicans</i> (e, f) and <i>Candida parapsilosis</i> (g, h) can be observed. <i>S. aureus</i> non-resistant cells showed almost no difference between the control and treatment, but some treated cells appear not to have completed cell division, as indicated by arrows (b). The resistant isolate 672 presented prominences on cell surfaces without alteration of morphology (d). Treated <i>C. albicans</i> (f) and <i>C. parapsilosis</i> (h) cells exhibited malformations with elongations (arrow) and bulges (arrowhead), and presence of cellular fragments.....	55
Figura 3 - Antibiofilm activity of ApuL against <i>Staphylococcus aureus</i> non-resistant (ATCC-6538) and oxacillin-resistant (UFPEDA-672) isolates, <i>Candida albicans</i> and <i>Candida parapsilosis</i> . The cells were treated for 24 h with sub-inhibitory concentrations until the MIC ₅₀ for each isolate. The bacterial growth and biofilm formation were determined by measuring optical density at 600 nm and by the crystal violet method, respectively. Non-treated cells corresponded to the negative control. (*) indicates statistical difference ($p < 0.05$) between the treatments and negative control, as analyzed by Student's <i>t</i> -test.....	56

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1 - Alguns tipos e exemplos de fatores de virulência.....	18
--	----

ARTIGO

Tabela 1 - Isolation sites of the bacterial clinical isolates used in this work and commercial antibiotics to which they are resistant.....	57
Tabela 2 - Evaluation of antimicrobial activity of ApuL and reference drugs (separated or in combination) against <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Candida parapsilosis</i>	58

LISTA DE SIGLAS

ApuL	Lectina da inflorescência de <i>Alpinia purpurata</i>
VFDB	Base de dados de fatores de virulência (do inglês <i>virulence factors database</i>)
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares (do inglês <i>extracellular polymeric substance</i>)
IAB	Infecções associadas a biofilmes
PAM	Peptídeo antimicrobiano
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina-resistente (do inglês <i>meticilin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ALL	Lectina da <i>Aplysina lactuca</i> (do inglês <i>Aplysina lactuca lectin</i>)
PgTeL	Lectina do suco de <i>Punica granatum</i> (do inglês <i>Punica granatum juice lectin</i>)
CasuL	Lectina de <i>Calliandra surinamensis</i> (do inglês <i>Calliandra surinamensis lectin</i>)
WSMoL	Lectina solúvel em água de sementes de <i>Moringa oleifera</i> (do inglês <i>Water-soluble Moringa oleifera seeds lectin</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.2	OBJETIVOS.....	16
1.2.1	Objetivo Geral.....	16
1.2.2	Objetivos Específicos.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	17
2.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MICROBIANA.....	18
2.3	BIOFILMES MICROBIANOS E INFECÇÕES ASSOCIADAS.....	19
2.4	ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES PATOGÊNICOS.....	22
2.5	LECTINAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME.....	24
2.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.8	GÊNERO <i>Candida</i> E INFECÇÕES ASSOCIADAS.....	29
2.9	<i>Alpinia purpurata</i>	30
3	ARTIGO.....	32
4	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de um microorganismo em causar uma doença e a gravidade dessa estão diretamente relacionadas a múltiplos mecanismos denominados fatotes de virulência, que atuam individualmente ou em conjunto nos diferentes estágios da infecção (WU *et al.*, 2008). Os fatores de virulência incluem a produção de toxinas, sistemas de secreção especializados, além da promoção de mecanismos de adesão as células e tecidos do hospedeiro através da produção de adesinas e da formação de biofilme, entre outros (RASKO & SPERANDIO, 2010). Como exemplo desses fatores de virulência temos a produção da piocianina e da alcalino protease pela cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* que induzem estresse ao retículo endoplasmático de células epiteliais brônquicas primárias em doenças pulmonares crônicas (VAN'T WOUT *et al.*, 2015), bem como a produção de adesina ligadora ao ácido siálico que desempenha papel fundamental no processo de adesão e colonização da bactéria *Helicobacter pylori* nas células do epitélio gástrico em pacientes com gastrite (KAO *et al.*, 2016).

Biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos em superfícies naturais ou sintéticas, formando uma estrutura tridimensional constituída por uma substância polimérica extracelular. Essa substância contém proteínas, lipídeos e polissacarídeos e confere aos microrganismos uma maior proteção e resistência contra agentes antimicrobianos, sistema imunológico de hospedeiros e estresses ambientais, além de possuírem canais que facilitam o acesso e transporte de substratos e moléculas sinalizadoras (USHA *et al.*, 2010; PERCIVAL *et al.*, 2012). Os biofilmes têm sido encontrados em diversos casos de infecções crônicas em pacientes com fibrose cística, otite média, cárie dentária e prostatite, além de infecções agudas; ainda, estão relacionados com contaminações nos mais variados dispositivos médicos (HOOPER *et al.*, 2011).

O fenômeno de resistência microbiana a antibióticos pode ser definido como o aumento no valor da concentração mínima inibitória (CMI) de um antibiótico devido a uma alteração permanente no microorganismo, que pode ser decorrente de mutação ou transferência horizontal de genes (OLSEN, 2015). Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que modificam ou destroem o agente antimicrobiano, mecanismos de exportação ou de prevenção da entrada do antimicrobiano na célula, ou ainda alterações estruturais nos alvos dos antimicrobianos (HOLMES *et al.*, 2016). Os mecanismos de resistência dos biofilmes incluem a capacidade da matriz polimérica extracelular em atuar como uma barreira que

impede a penetração dos antibióticos na célula microbiana e também a capacidade dessa matriz em produzir enzimas hidrolíticas que degradam os antimicrobianos como as β -lactamases, atuam na regulação do metabolismo microbiano diminuindo a atividade metabólica das células presentes no biofilme o que aumenta a tolerância a alguns antibióticos que atuam no processo de crescimento microbiano, entre outros (OLSEN, 2015). Os microrganismos presentes em um biofilme possuem cerca de 100 a 1.000 vezes mais resistência a antimicrobianos em comparação com as células planctônicas, o que torna as infecções associadas a biofilmes muito mais difíceis de erradicar (HOIBY *et al.*, 2011).

A alta tolerância dos biofilmes aos antibióticos e a ineficiência em diagnosticar corretamente infecções causadas por biofilmes estão correlacionadas com a gravidade das condições clínicas do paciente. Por conta disso estratégias como o uso de combinações de antibióticos e a busca por novos compostos com atividade antibiofilme tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (HERRMANN *et al.*, 2010; ROY *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado a ação antimicrobiana e antibiofilme de diferentes produtos naturais (NEGREIROS *et al.*, 2016; LOU *et al.*, 2017). Dentre esses, encontram-se as lectinas, proteínas de origem não-imunológica, encontradas ubiquamente na natureza e que possuem um domínio não-catalítico com capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados (LAM *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2015). Essa propriedade de ligação específica a carboidratos confere às lectinas a capacidade de atuar nos mais diversos sistemas e processos biológicos, inclusive o crescimento de células microbianas e a formação de biofilmes (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2016; DE CARNEIRO *et al.*, 2017a; MOURA *et al.*, 2017).

Alpinia purpurata (Vieill) K. Schum é uma planta nativa das ilhas do Pacífico e utilizada mundialmente principalmente para ornamentação (SANTOS *et al.*, 2012). Porém, estudos demonstram que a *A. purpurata* possui diversas atividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana e inseticida (VILLAFLORES *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012; RAJ *et al.*, 2016). Sua inflorescência contém uma lectina, ApuL, que possui propriedades imunomodulatórias (BRITO *et al.*, 2017).

Dentro do contexto apresentado acima, este trabalho investigou a ação antimicrobiana e antibiofilme de ApuL frente a isolados bacterianos e fúngicos susceptíveis e resistentes a antibióticos. Foram analisados também mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana de ApuL e efeitos de combinações da lectina em associação a antibióticos comerciais no crescimento e sobrevivência dos microrganismos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da lectina da inflorescência de *Alpinia purpurata* (ApuL) frente a bactérias e fungos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Purificar a lectina da inflorescência de *Alpinia purpurata* (ApuL) de acordo com protocolo pré-estabelecido.
- b) Investigar a atividade antimicrobiana da lectina contra bactérias e fungos, susceptíveis e resistentes a antibióticos.
- c) Analisar alterações da permeabilidade da membrana celular através da avaliação do extravasamento proteico após incubação dos microrganismos com a lectina.
- d) Avaliar alterações estruturais nas células bacterianas e fúngicas tratadas com a lectina.
- e) Investigar a atividade antibiofilme da lectina frente a biofilmes bacterianos e fúngicos.
- f) Avaliar os efeitos de combinações de ApuL com antibióticos/antifúngicos comerciais no crescimento e sobrevivência dos microrganismos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA

Um patógeno pode ser definido como um organismo que causa ou pode causar danos a um hospedeiro (PIROFSKI & CASADEVALL, 2012). O estabelecimento ou não do processo infeccioso está diretamente relacionado a virulência e patogenicidade do microrganismo, bem como à condição do hospedeiro diante de fatores de risco, tais como idade, estresse, dieta e estado imunológico, que são determinantes para a sua susceptibilidade a infecções (BECEIRO *et al.*, 2013).

A patogenicidade de um agente infeccioso corresponde à capacidade de produzir sintomas em maior ou menor proporção dentre os hospedeiros infectados. No caso de agentes de alta patogenicidade, a maior parte dos infectados apresenta sinais e sintomas. Já a virulência corresponde à capacidade de um patógeno de produzir efeitos graves ou fatais. Os denominados ‘fatores de virulência’ são responsáveis por aumentar tanto a patogenicidade quanto a virulência de um patógeno, estando envolvidos com a capacidade desse de sobreviver no organismo hospedeiro, estabelecer uma infecção e posteriormente causar uma doença (CHEN *et al.*, 2012). Esses fatores estão envolvidos tanto na interação direta com as células do tecido do hospedeiro como no processo de ocultação da célula microbiana dos mecanismos de defesa do hospedeiro (WU *et al.*, 2008).

Os fatores de virulência podem ser moléculas, estruturas ou mecanismos, como por exemplo: proteínas de adesão (adesinas, fibronectinas); proteínas hidrolíticas (toxinas, enzimas); componentes da membrana celular (cápsulas polissacarídicas); alternância entre as formas de hifa e filamentosa nos patógenos fúngicos; alterações nos componentes da parede celular em patógenos bacterianos; formação de sideróforos, formação de biofilme, entre outros (WU *et al.*, 2008; ZECCONI & SCALI, 2013). Em consulta realizada em 28 de janeiro de 2018, o banco de dados virtual *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* (VFDB) já havia compilado 1796 fatores de virulência (532 comprovados experimentalmente) de 74 gêneros diferentes de bactérias com o envolvimento de mais de 30.178 genes (<http://www.mgc.ac.cn/VFs>). A seguir, na Tabela 1 estão listados alguns tipos e exemplos de fatores de virulência.

Tabela 1 - Alguns tipos e exemplos de fatores de virulência.

Tipos	Exemplo (patógeno)
Fatores de adesão	EbpS (<i>Staphylococcus aureus</i>) Pili tipo IV (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) YapE (<i>Yersinia pestis</i>)
Fatores de invasão	Opa (<i>Neisseria meningitidis</i>) LasA (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) CiaB (<i>Campylobacter jejuni</i>)
Inibidores de resposta imune	SCIN (<i>Staphylococcus aureus</i>) Antígeno Vi (<i>Salmonella enterica</i>) Proteína P2 (<i>Haemophilus influenzae</i>)
Toxinas	Gliotoxina (Gênero <i>Aspergillus</i>) HBL (<i>Bacillus cereus</i>) CdtB (<i>Salmonella enterica</i>)
Sideróforos	Acinetobactina (<i>Acinetobacter baumannii</i>) Pioverdina (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) Hemolisina (<i>Candida tropicalis</i>)
Produção de biofilme	PNAG (<i>Acinetobacter baumannii</i>) BopD (<i>Enterococcus faecalis</i>) β -glucano (<i>Candida albicans</i>)

Fontes: Virulence Factor Database (www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm); Finkel & Mitchell (2011); Chotirmall *et al.* (2014); Deorukhkar, *et al.* (2014).

2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MICROBIANA

O número e a frequência de infecções bacterianas e fúngicas ocasionadas por microrganismos resistentes a múltiplos fármacos têm aumentado globalmente, ampliando o espectro de infecções graves denominadas “intratáveis” (WALKER & FOWLER, 2011). Um microrganismo pode adquirir ou desenvolver resistência através de diversos mecanismos que podem ser: através da diminuição da concentração intracelular do antibiótico devido a uma fraca penetração no microrganismo ou do efluxo do agente antimicrobiano; inativação

enzimática do antibiótico através de hidrólise; ou através da modificação do alvo do antibiótico por mutação genética ou modificações pós-tradução (BLAIR *et al.*, 2015).

Um exemplo da diminuição do acesso do antimicrobiano ao seu alvo é através da redução da permeabilidade da membrana. Essa redução pode ser intrínseca, como nos casos das bactérias gram-negativas, que possuem uma membrana externa e cuja membrana celular possui menos lipídeos aniônicos do que a das gram-positivas, sendo então menos susceptíveis a uma gama de antibióticos tais como o lipopeptídeo daptomicina (RANDALL *et al.*, 2013). A redução da permeabilidade também pode ser adquirida como, por exemplo, algumas enterobactérias que adquirem genes que conferem expressão diminuída de porinas, o que aumenta significativamente sua resistência a carbapenemos e cefalosporinas (WOZNIAK & WALDOR, 2010; LAVIGNE *et al.*, 2013).

A modificação do alvo do antibiótico pode ser exemplificada através da capacidade de algumas cepas de *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* de resistir à ação da linezolida através da mutação em cópias idênticas de genes que codificam sua subunidade ribossomal 23S, modificando-a e assim impedindo a ligação da linezolida (GAO *et al.*, 2010; BILLAL *et al.*, 2011). Outro exemplo é o caso de cepas do gênero *Candida* em que mutações pontuais modificam o gene *fks1*, que codifica a 1,3- β -D glucano sintase, principal alvo dos antifúngicos equinocandinas (PERLIN, 2007).

Em relação à inativação através da hidrólise dos antibióticos, já foram identificados milhares de enzimas que podem degradar e/ou modificar as mais diferentes classes de antibióticos, desde os mais antigos como os β -lactâmicos até os mais recentes como os carbapenemos (BLAIR *et al.*, 2015). Diversos estudos já relatam a existência de cepas de enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* que produzem β -lactamases de espectro estendido e carbapenemases, o que lhe confere resistência a todos os β -lactâmicos além de alguns carbapenemos como o imipenem, resultando em sérias implicações para tratamentos de infecções graves, sobretudo em ambientes hospitalares (VOULGARI *et al.*, 2013).

2.3 BIOFILMES MICROBIANOS E INFECÇÕES ASSOCIADAS

Biofilme é um conjunto homogêneo ou heterogêneo de microrganismos envoltos por uma matriz autoproduzida formada por uma substância polimérica extracelular (EPS, do inglês *extracellular polymeric substance*), o que lhe confere a capacidade de aderir a

superfícies, tanto bióticas como abióticas (CORTES *et al.*, 2011; HURLOW *et al.*, 2015). A matriz constitui cerca de 90% do peso seco da maioria dos biofilmes e é diretamente responsável pela arquitetura tridimensional e coesão (FLEMMING & WINGENDER, 2010). A EPS é constituída principalmente por polissacarídeos, mas também contém várias outras moléculas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (CORTES *et al.*, 2011).

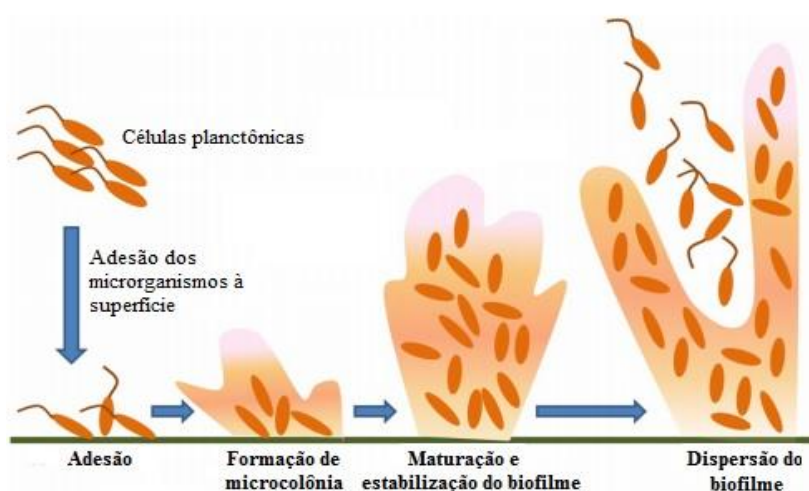
A formação de um biofilme (Figura 1) é guiada por processos químicos, físicos e biológicos (GUPTA *et al.*, 2015). O primeiro estágio corresponde à ligação entre as células planctônicas e adesão à superfície através de atrações físicas como forças de Van der Waals, interações estéticas e eletrostáticas, sendo moduladas por fatores como a natureza química da superfície, temperatura e pressão (GARRET *et al.*, 2008; GUPTA, *et al.*, 2015). O segundo estágio se dá quando as forças de atração entre as ligações celulares são maiores que as de repulsão, consequentemente tornando a interação entre as células microbianas irreversíveis (GARRET *et al.*, 2008). O terceiro estágio é a fase de maturação, onde se inicia a comunicação e a troca de informações entre as células microbianas, a expressão de genes específicos para a produção de sinais autoindutores, e a secreção da EPS para promover a estabilidade e estrutura ao biofilme (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). No estágio seguinte, há um aumento significativo do tamanho das microcolônias pertencentes ao biofilme, onde sua espessura chega até a 100 μm (GUPTA *et al.*, 2015). O último estágio é onde ocorre a dispersão do biofilme, ou seja, as células se separam, se destacam da superfície e retornam ao seu estado planctônico, podendo agora colonizar e formar biofilmes em outras superfícies (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2015).

Além da adesão, o biofilme promove interações moleculares entre as células formadoras, incluindo troca de informações genéticas e funciona como uma barreira de proteção contra o sistema imune do hospedeiro, bem como oferece resistência a agentes antimicrobianos (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Estima-se que a formação de biofilme esteja ligada a cerca de 60 a 80% dos processos infecciosos, e está muitas vezes relacionada como a causa da ineficiência de agentes antimicrobianos (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

As infecções associadas a biofilmes (IABs) representam cerca de 80% das infecções bacterianas em hospedeiros humanos (RÖLIMG & BALSALOBRE, 2012; SUN *et al.*, 2013). Os biofilmes, na maioria das vezes, são responsáveis por infecções crônicas, sendo geralmente resistentes tanto ao sistema imune do hospedeiro quanto à terapia antimicrobiana (HOIBY *et al.*, 2015). Alguns casos onde a formação de biofilme desempenha papel em

infecções agudas também têm sido relatados (HANNAN *et al.*, 2012). Essas infecções podem ser causadas por biofilmes mono ou multiespécies, sendo que interações entre espécies aumentam a persistência e resistência (RÖLING & BALSALOBRE, 2012).

Figura 1 - Estágios de formação de um biofilme.



Fonte: Adaptado de Gupta *et al.* (2015).

Biofilmes são comumente encontrados em infecções tais como cáries dentárias, periodontite, osteomielite crônica, rinossinusite crônica, infecções de feridas crônicas, infecções recorrentes do trato urinário, endocardite e prostatite crônica, e também estão presentes em infecções associadas a doenças inflamatórias como doença de Crohn e infecção pulmonar associada à fibrose cística (BURMOLLE *et al.*, 2010; ZIJNGE *et al.*, 2010). Essas infecções tanto podem ter sua origem da própria microbiota do hospedeiro (BURMOLLE *et al.*, 2010) como podem ser derivadas de biofilmes formados em dispositivos médicos como cateteres venosos e urinários, próteses auriculares, cateteres de diálise peritoneal, lentes de contato, válvulas cardíacas mecânicas, entre outros (SUN *et al.*, 2013). Os principais patógenos comumente associados a IABs incluem as bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, gram-negativas tais como *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*, e fungos dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* (MARKS *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2013).

Classificar e diferenciar uma infecção como associada à biofilme ou causada por microrganismos planctônicos representa um significativo desafio para a prática clínica

(HALL-STOODLEY *et al.*, 2012). Os critérios de diferenciação vão desde a observação de bactérias agregadas em uma infecção localizada, ineficácia da resposta imune do hospedeiro até à presença de resistência a antibióticos; porém, esses critérios muitas vezes necessitam do suporte de técnicas moleculares e de visualização avançadas para uma detecção confiável (RÖLIMG & BALSALOBRE, 2012).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana ligados a biofilmes têm sido elucidados (MAH, 2012). Um desses mecanismos é a capacidade da matriz de impedir o contato dos antimicrobianos com as células microbianas do biofilme como, por exemplo, a incapacidade de aminoglicosídeos em penetrar biofilmes formados por *P. aeruginosa* (MAH, 2012). Outro exemplo é inibir a ação de antimicrobianos, como enzimas que atuam na entrega do β -1-3 glucano para a formação da matrix, que está diretamente associado ao gene glucano sintase FKS1 que confere resistência a biofilmes de *Candida* contra antifúngicos como os azóis (TAFF *et al.* 2012), e o DNA extracelular presente na matriz de biofilmes de *Candida* que confere resistência ao fluconazol (TAFF *et al.*, 2013). Outra forma efetiva de resistência é a expressão diferencial de genes de resistência a antibióticos biofilme-específicos (DE LA FUENTE-NUÑEZ *et al.*, 2013), como exemplo os genes PA185-PA187, que codificam a formação de bombas de efluxo que estão diretamente ligadas à multirresistência de biofilmes de *E. coli* (LI & NIKAIDO, 2009).

2.4 ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES PATOGÊNICOS

Por conta da alta resistência aos diversos antimicrobianos, os biofilmes geralmente são clinicamente tratados com uma combinação de diferentes drogas, geralmente bastante agressivas, mas que são as únicas alternativas encontradas na prática clínica (DE LA FUENTE-NUÑEZ *et al.*, 2013). Por conta disso, recentes estudos têm procurado novas estratégias para prevenção e erradicação de biofilmes (HOWLIM *et al.*, 2015; GUGALA *et al.*, 2017). Novos agentes naturais, sintéticos ou semi-sintéticos têm sido utilizados como alternativa para tratamento de IABs; o uso de misturas de diferentes compostos possui a vantagem de congrega diferentes modos de ação, se tornando assim menos favorável ao surgimento de resistência em comparação com o tratamento com antibióticos clássicos (SUN *et al.*, 2013).

Agentes como os peptídeos antimicrobianos (PAMs) possuem a capacidade de se ligar a moléculas negativamente carregadas que compõem a estrutura da membrana microbiana,

induzindo ou uma falha em larga escala ou pequenos defeitos nessa membrana que dissipam o potencial transmembranar causando a morte celular; atuando essencialmente em casos de microrganismos com pouca ou nenhuma taxa de crescimento, como no caso dos microrganismos presentes nos biofilmes (JORGE *et al.*, 2012). Esses compostos são formados geralmente por 15 a 30 aminoácidos e fazem parte do sistema imune inato de animais e vegetais, bem como podem ser produzidos por fungos e bactérias (JORGE *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos demonstram a capacidade de desenvolvimento de PAMs específicos para um ou mais microrganismos (HE *et al.*, 2009). O estudo realizado por Li *et al.* (2010) demonstrou a ação antimicrobiana específica de um PAM contra biofilmes orais formados por *Streptococcus mutans*.

Os bacteriófagos, vírus com capacidade de parasitar bactérias, também têm sido utilizados como agentes para tratamento de IABs por conta do seu potencial de burlar a proteção ofertada pelos biofilmes através de mecanismos como a produção de enzimas chamada polissacarídeo depolimerases, que degradam a matriz do biofilme (HANLON *et al.*, 2001; DONLAN, 2009;). SETH *et al.* (2013) demonstraram a capacidade de um sistema terapêutico com bacteriófagos no tratamento de infecções crônicas de feridas causadas por biofilmes de *S. aureus*.

Estudos demonstram a capacidade de combinação de métodos físicos, como o ultrassom de baixa frequência, com antibióticos comerciais para remoção e tratamento de IABs (CARMEN *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2013). Outra estratégia contra as IABs é a utilização de inibidores de *quorum-sensing*, sistema de sinalização bacteriano inter e intraespécies que tem como função promover a comunicação entre as bactérias bem como modular diversos genes, como os responsáveis por expressão de fatores de virulência e formação de biofilme (UROZ *et al.*, 2009). Esses inibidores possuem a capacidade de atenuar a ação dos sinais autoindutores e com isso têm sido utilizados como tanto sozinhos como associados com antibióticos (SUN *et al.*, 2013). Compostos naturais, como as furanonas halogenadas e os cinamaldeídos e seus análogos sintéticos, têm demonstrado ação anti *quorum-sensing* contra diversos biofilmes bacterianos (BRACKMAN *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2012).

Compostos naturais derivados de plantas com atividade antibiofilme também têm sido descritos (NADER *et al.*, 2014; SELIM *et al.*, 2014). Estudo realizado por Jadhav *et al.* (2013) demonstrou que o óleo essencial obtido da *Achillea millefolium* possui a capacidade de inibir a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em superfícies de poliestireno.

MURUGAN *et al.* (2013) demonstraram que diferentes extratos de *Achyranthes aspera* possuem atividade antibiofilme e anti *quorum-sensing* contra isolados cariogênicos de *S. mutans*.

2.5 LECTINAS COM ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME

Lectinas são proteínas que podem ser encontradas em plantas, microrganismos e animais, e apresentam a capacidade de se ligar reversivelmente e seletivamente a carboidratos ou glicoconjugados através de diversas interações como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (LAM & NG, 2010; PAIVA *et al.*, 2010). Por conta dessa capacidade, as lectinas apresentam as mais diversas atividades biológicas tais como imunomodulatória (BRITO *et al.*, 2017; CORIOLANO *et al.*, 2014), antiviral (AKKOUH *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017), inseticida (PAIVA *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2015) e anti-inflamatória (ABREU *et al.*, 2016), entre outras.

Além dessas atividades, as lectinas também têm se destacado como potenciais agentes antimicrobianos (SAHA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2017a). Chandrasekaran *et al.* (2016) relataram a existência de uma lectina extraída do cogumelo medicinal *Sparassis latifolia* com atividade antibacteriana contra *E. coli* e cepas resistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, além de atividade antifúngica contra espécies do gênero *Candida* e *Fusarium*. A lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca* demonstrou capacidade de reduzir significativamente a biomassa de biofilmes bacterianos de *E. coli* em todas as concentrações testadas e biofilmes de *S. aureus* com efeito dose dependente em concentrações que variavam de 15,6 a 250 µg/mL (CARNEIRO *et al.*, 2017b). Um estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2014) demonstrou que lectinas extraídas das plantas e algas *Cratylia floribunda*, *Vatairea macrocarpa*, *Bauhinia bauhinioides*, *Bryothamnion seaforthii* e *Hypnea musciformis* inibem o crescimento das células de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis* tanto em suas formas planctônicas como em biofilmes.

O efeito antibacteriano das lectinas envolve o reconhecimento e interação específica dessas proteínas com componentes das paredes celulares bacterianas como os ácidos teicóicos e teicurônicos. Essa interação pode levar à inibição do crescimento bacteriano através de alteração da permeabilidade celular, o que leva a uma má absorção de nutrientes, e/ou ao

desencadeamento de respostas intracelulares através da interação com os receptores de membrana (KARNCHANATAT, 2012). Alguns autores também sugerem que as lectinas possuem a capacidade de formar poros nas superfícies celulares bacterianas, o que resulta em extravasamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, morte da célula bacteriana (MOURA *et al.*, 2015). A interação com carboidratos da superfície microbiana também ocasiona aglutinação e consequente imobilização das células, o que facilita a ação dessas e de outras moléculas com atividade antibiótica em um número muito maior de células (SAHA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015).

Segundo Melo *et al.* (2005) a lectina de *Luetzelburgia auriculata* foi capaz de inibir o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* interagindo tanto na superfície da membrana celular como penetrando na parte interna como observado na microscopia eletrônica de transmissão, onde seus resultados sugeriram que a lectina foi capaz de interferir no transporte intracelular de prótons para o ambiente externo. Chikalovets *et al.* (2015) sugeriram que inibição do crescimento fúngico pelas lectinas ocorre através de ligação com as hifas, resultando em uma fraca absorção de nutrientes bem como interfere na germinação dos esporos. Alguns estudos também sugerem que a variação na susceptibilidade dos fungos às lectinas está diretamente ligada às diferenças na composição da parede celular fúngica ou possui relação com o tamanho da lectina e sua consequente capacidade em penetrar nas células fúngicas através da parede celular (ZVEREVA & VYSOTSKAYA, 2005).

Em relação à ação antibiofilme, estudos sugerem que a capacidade das lectinas de se ligarem a carboidratos bem como a outras moléculas, como proteínas, pode interromper a polimerização desses componentes, impedindo a formação de biofilme (SAHA *et al.*, 2014). A lectina do suco de *Punica granatum* (PgTeL) apresentou intensa atividade antifúngica contra as cepas de *Candida krusei* e *Candida albicans*, além de inibir a formação do biofilme de *Candida albicans*, atuando através da indução do desequilíbrio osmótico e perturbação das membranas celulares, além da formação de peróxidos lipídicos, o que levou a diversas deformidades as estruturas celulares das leveduras, colapso energético e consequente morte celular por lise (DA SILVA *et al.*, 2018). Procópio *et al.* (2017) demonstraram que a lectina de *Calliandra surinamensis* (CasuL) apresentou atividade bacteriostática moderada contra as cepas resistentes e não resistentes a oxacilina de *S. aureus* e *S. saprophyticus* e uma ação antifúngica contra *Candida krusei*, contudo sendo capaz de inibir significativamente os biofilmes formados pela cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina e principalmente contra a *S. saprophyticus*, demonstrando contra esta última uma inibição de 72% da formação de

biofilme e um efeito dose dependente. Moura *et al.* (2017) demonstraram o potencial da lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) em impedir a formação de biofilmes de *Serratia marcescens* e *Bacillus* sp. em placas de poliestireno, impedindo a agregação das células entre si e a aderência destas na placa de poliestireno, além de causar alteração na morfologia celular como alongamento das células e multiseptação, além disso WSMoL também foi capaz de erradicar biofilmes pré-formados de *Bacillus* sp. nas placas de poliestireno, por conta disso os autores propoem que WSMoL atinge o crescimento e limitam o número de células capazes de formar o biofilme.

2.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva que habita comensalmente o epitélio dos seres humanos (TONG *et al.*, 2015). Porém, em algumas situações, pode se tornar um patógeno oportunista, sendo um dos principais microrganismos encontrados em infecções nosocomiais dos mais diferentes tecidos do corpo humano (DE KRAKER *et al.*, 2011). É um dos grandes responsáveis por bacteremias em diversas regiões do mundo, atingindo cerca de 10-30 indivíduos a cada 100 mil por ano (LAUPLAND *et al.*, 2013), sendo esses principalmente pessoas com idade avançada ou com imunodeficiências, como os infectados pelo HIV (LAUPLAND *et al.*, 2013). É o principal causador de endocardites infecciosas, sendo encontrado em cerca de 16 a 34% dos casos relatados (THUNY *et al.*, 2005; TONG *et al.*, 2015). Também pode ser encontrado em casos de sepse, infecções pulmonares como a pneumonia, infecções osteoarticulares como osteomielite e artrite séptica, infecções de pele e do tecido mole, síndrome do choque tóxico, infecções do trato urinário, dentre outros (FOSTER *et al.*, 2014; TONG *et al.*, 2015).

Essa bactéria é capaz de produzir uma gama de fatores de virulência (Figura 2) e desenvolver resistência múltipla a diversos antibióticos (STEFANI *et al.*, 2012; FOSTER *et al.*, 2014). Algumas cepas são capazes de adquirir resistência à meticilina através de um gene denominado *mecA*, que codifica uma forma modificada da proteína ligadora de penicilina que possui baixa afinidade com os antibióticos β -lactâmicos, o que impede assim a atuação desses fármacos (MONECKE *et al.*, 2011). *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) surgiu primeiramente em ambientes hospitalares, mas já foi encontrada em ambientes comunitários e também associado ao gado (STEFANI *et al.*, 2012). MRSA é um dos principais causadores de infecções de pele e de infecções hospitalares graves, principalmente em casos de infecções

2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

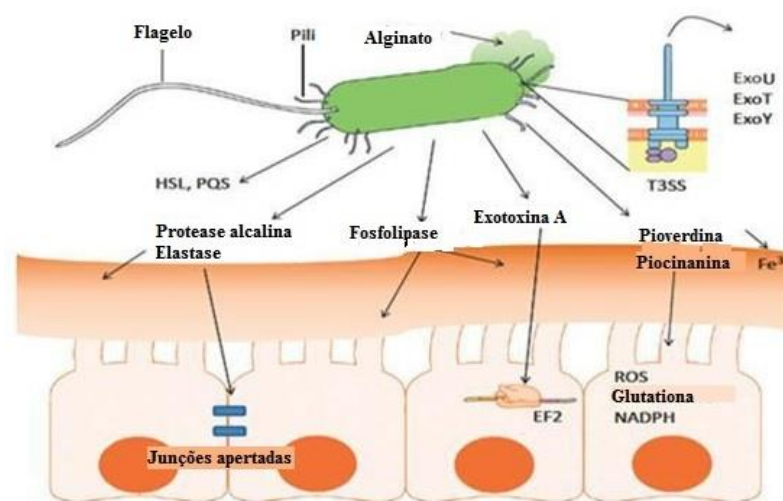
Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa que comumente habita o solo e locais próximos a superfícies aquáticas, porém possui a capacidade de sobreviver em uma gama de ambientes tanto naturais como artificiais através da sua considerável adaptabilidade e sua resistência intrínseca a antibióticos (GELLATLY & HANCOCK, 2013). É um dos principais patógenos oportunistas em seres humanos, sendo responsável por causar uma variedade de doenças em indivíduos imunocomprometidos, especialmente infecções de tecido mole em pacientes que sofreram queimaduras e infecções tanto agudas quanto crônicas em feridas (LI *et al.*, 2005; TURNER *et al.*, 2014). É um dos principais causadores de infecções respiratórias nosocomiais, especialmente em pacientes com danos ocasionados por intubação ou inalação de fumaça, e infecções respiratórias persistentes em pacientes com fibrose cística, e está diretamente relacionada à alta incidência de insuficiência respiratória, transplantes pulmonares e mortalidade desses indivíduos (FOLKESSON *et al.*, 2012; GELLATLY & HANCOCK, 2013).

Um fator determinante para a elevada virulência e patogenicidade dessa espécie é seu arsenal intrínseco de mecanismos de resistência, como alteração na permeabilidade celular, inúmeras bombas de efluxo multidrogas, produção de enzimas como metaloproteínases, além de uma complexa rede de sinalização que detecta e reage às mais diversas moléculas, sejam endógenas do hospedeiro ou sintéticas, provocando mudanças significativas na sua expressão gênica, o que a torna adaptável e resistente aos mais diversos ambientes e agentes antimicrobianos (BREATHNACH *et al.*, 2012; JIMENEZ *et al.*, 2012). Por exemplo, estudos com cepas que apresentavam mutações no gene *ftsK*, responsável pela divisão celular, demonstravam que por conta dessa mutação elas adquiriam resistência intrínseca a ciprofloxacina e antibióticos β -lactâmicos (ALVAREZ-ORTEGA *et al.*, 2010). Além disso, a capacidade de *P. aeruginosa* em formar biofilme também está diretamente relacionada a sua alta virulência em diversos tipos de infecções que ela pode causar, incluindo formas mais graves de infecções pulmonares ligadas à fibrose cística, otite média crônica e prostatite médica crônica, e infecções ligadas a dispositivos médicos principalmente cateteres urinários e intravasculares, próteses mamárias e implantes cocleares (TOLKER-NIELSEN, 2014). Na Figura 3 estão apresentados alguns fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

2.8 GÊNERO *Candida* E INFECÇÕES ASSOCIADAS

O gênero *Candida* compreende um grupo de fungos ascomicetos que possui o formato leveduriforme e são amplamente distribuídos na natureza, vivendo saprofitamente na microbiota humana normal; no entanto, podem se tornar patógenos oportunistas transitando de uma forma comensal para uma forma patogênica dependendo das condições do hospedeiro (PAPON *et al.*, 2013). As espécies de *Candida* raramente causam infecções em indivíduos saudáveis, mas se aproveitam de alguns fatores que comprometem o sistema imune do indivíduo (tais como doenças imunossupressoras como HIV, cirurgias, queimaduras, tratamentos intensivos com antibióticos, uso de imunossupressores, entre outros) para se proliferar no organismo do hospedeiro e causar processos infecciosos denominados “candidíases” (PAPON *et al.*, 2013; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013). Podem causar infecções superficiais na pele e nas mucosas (principalmente orofaríngea e vulvovaginal), infecções sistêmicas como candidemia (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Figura 3 - Fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.



Flagelos e pili são as principais estratégias de adesão e, juntamente com o lipopolissacarídeo, são estruturas altamente inflamatórias. Uma vez que ocorre o contato com o epitélio do hospedeiro, o sistema secretor tipo 3 (T3SS) é ativado, sendo capaz de injetar citotoxinas (ExoU, ExoT, ExoY, por exemplo), diretamente dentro da célula do hospedeiro. As proteases secretadas podem degradar proteínas do sistema complemento e mucinas, bem como romper as junções entre as células, facilitando a disseminação da bactéria. Fosfolipases atacam os lipídios nos surfactantes e nas membranas das células do hospedeiro. Piocianina, um pigmento de cor verde, é capaz de interferir com as vias de transporte de elétrons e com o ciclo redox na célula do hospedeiro. Pioverdina

é capaz de capturar Fe^{3+} aumentando as chances dessa bactéria em um ambiente de competição onde houver escassez de ferro. Autoindutores (homoserina lactonas, HSL, e proteínas *quorum sensing*, PQS) são secretados para iniciar a formação de biofilmes. Fonte: Gellatly e Hancock (2013)

Dentre as espécies desse gênero, *C. albicans* é a mais encontrada em infecções oportunistas, porém outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* também têm sido isoladas clinicamente em hospitais ao redor do mundo (PFALLER *et al.*, 2010; NAGLIK *et al.*, 2011). Esses cinco microrganismos são responsáveis por mais de 90% dos casos de infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, onde as taxas de mortalidade podem chegar a 45%, devido a métodos de identificação ineficientes e tratamentos antifúngicos iniciais inapropriados (MACCALLUM, 2012; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013). Além desses fatores, os mecanismos de resistência a antifúngicos também contribuem para os agravamentos dessas infecções. Esses mecanismos incluem: redução do acúmulo intracelular da droga, diminuição da afinidade do alvo pela droga, mecanismos de contra-ataque contra o efeito da droga e a formação de biofilme (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013). Skiest *et al.* (2007) descreveram que cepas de *C. albicans* resistentes a azóis, como o fluconazol, são frequentemente encontradas em pacientes HIV positivos com candidíase orofaríngea. Casos de resistência a equinocandinas por cepas de *C. glabrata* e *C. tropicalis* têm sido relatados, além da emergência de isolados clínicos de *C. glabrata* resistentes tanto a equinocandinas quanto a azóis (GROSSET *et al.*, 2016; HEALEY *et al.*, 2016).

2.9 *Alpinia purpurata*

Alpinia purpurata (Vieill) K. Schum é uma planta herbácea perene nativa das ilhas do Pacífico e cultivada em larga escala no Brasil e na Índia, sendo reconhecida internacionalmente como uma planta ornamental para vasos e paisagens (SABU, 2006; SANTOS *et al.*, 2012). Apesar de ser usada principalmente para ornamentação, são relatados usos como planta medicinal para algumas enfermidades como o uso das flores pela comunidade para tratamento de tosse na Venezuela (BERMÚDEZ & VELÁZQUEZ, 2002). Além disso, estudos já relatam algumas atividades biológicas desta planta, tais como a atividade vasodilatadora *in vitro* (VICTÓRIO *et al.*, 2009), inseticida (SANTOS *et al.*, 2012) e antioxidante (RAJ *et al.*, 2016), além de atividades antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e anti-inflamatória (VILLAFLORES *et al.*, 2010). Óleo essencial foi extraído das

folhas e seus componentes químicos majoritários identificados, sendo o maior deles o β -pineno (VICTÓRIO *et al.*, 2010). SANTOS *et al.* (2012) identificaram os constituintes do óleo essencial das inflorescências de *A. purpurata* e detectou que esses óleos possuem atividade larvica e contra *Aedes aegypti*, bem como atividade antibacteriana contra cepas susceptíveis e resistentes de diversas bactérias, com valores de concentração mínima inibitória (CMI) variando de 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 4 - Inflorescência de *Alpinia purpurata* (A) e *Alpinia purpurata* (B).



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/68539225558307959/>

Uma lectina foi isolada a partir de inflorescências de *A. purpurata* (ApuL). ApuL é uma proteína acídica e oligomérica, com massa molecular nativa de 34 kDa, e atividade hemaglutinante resistente ao aquecimento e estimulada na presença de íons cálcio e magnésio. Essa lectina apresentou ação imunomoduladora sobre células mononucleares de sangue periférico humano, sendo capaz de induzir a liberação de óxido nítrico, citocinas pertencentes aos perfis Th1 (IFN-gama, TNF-alfa e IL-6) e Th17 (IL-17A), e da citocina regulatória IL-10 (BRITO *et al.*, 2017).

3 ARTIGO

Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“International Journal of Biological Macromolecules”



Fator de impacto: 3.671

Instruções para autores: <https://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-biological-macromolecules/0141-8130/guide-for-authors>

Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity

Gustavo Ramos Salles Ferreira^a, Jéssica de Santana Brito^a, Thamara Figueiredo Procópio^a, Nataly Diniz de Lima Santos^a, Bárbara José Rocha Cardoso de Lima^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Tatiana Soares^b, Maiara Celine de Moura^a, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Brazil.*

^c*Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: thiago86@yahoo.com.br

Abstract

In the present work, we evaluated the antimicrobial action of *Alpinia purpurata* inflorescence lectin (ApuL) against human pathogens. ApuL showed bacteriostatic activity against non-resistant and an oxacillin-resistant isolate (UFPEDA-672) of *Staphylococcus aureus* with minimal inhibitory concentrations (MIC₅₀) of 50 and 400 µg/mL, respectively, and bactericidal effect on non-resistant isolate (minimal bactericidal concentration: 200 µg/mL). ApuL-oxacillin combination showed synergistic effects on two other oxacillin-resistant isolates (UFPEDA-670 and 671), which were not sensitive to lectin alone. Analysis of growth curves, protein leakage, and ultrastructural changes supported that ApuL acts through distinct mechanisms on *S. aureus* isolates. Synergism was also detected for ApuL-ceftazidime against a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant isolate. For *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, ApuL showed fungistatic (MIC₅₀: 200 and 400 µg/mL, respectively) and fungicidal (minimal fungicidal concentration: 400 µg/mL) effects. Synergistic action of ApuL-fluconazole was detected for *C. parapsilosis*, which was insensitive to the drug alone. Ultrastructural analysis of ApuL-treated *Candida* cells revealed malformations with elongations and bulges. Biofilm formation by *S. aureus* non-resistant isolate and *C. albicans* was remarkably inhibited by ApuL (sub-inhibitory concentrations). In conclusion, ApuL showed differential effects on non-resistant and resistant bacterial isolates, was active against *Candida* species, and showed synergistic action in combination with antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; *Candida*; oxacillin; multi-drug resistance; fluconazole.

1. Introduction

Pathogenic microorganisms represent a growing concern in public health since the overuse and misuse of antibiotics have led to the rapid emergence of resistant isolates [1]. This situation has stimulated the search for new molecules for controlling pathogens to be used alone or as additive or synergistic agents in combined therapies together with the currently available antibiotics [2].

Resistance to antimicrobials is an important survival mechanism that favors microorganisms in the infection process. In bacteria, some of the molecular and biochemical mechanisms of resistance involve inactivation or modification of drugs by enzymes, development of efflux pumps, alterations in membrane permeability, and structural changes to barriers and antibiotic targets [3, 4]. The tolerance that some pathogens develop against antimicrobial drugs leads to acute, persistent, chronic, and relapsing human infections [5].

The degree of pathogenicity of a microorganism depends directly on its virulence factors, which correspond to mechanisms that increase the ability to cause an infection [6]. These mechanisms include structures, strategies, or production of substances that aid the microorganism in tissue invasion and in evading the immune system defenses. For example, the formation of biofilms is a notorious strategy by which microorganisms improve their resistance [7]. Biofilms are complex microbial communities with higher resistance to adverse conditions and commercial drugs than planktonic forms. In addition, this lifestyle facilitates host colonization [8, 9].

The pathogenic gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* has an intrinsic resistance to penicillin and cephalosporin, conferred mainly by the overproduction of β -lactamases [4, 10]. This species commonly cause nosocomial infections, the most frequent cause of respiratory infections, in immunocompromised patients [11]. *Staphylococcus aureus* is a gram-positive bacterium that causes several types of infections such as bacteremia; endocarditis; and infections in bone, respiratory, and endovascular tissue [12]. Currently, there are reports on the occurrence of isolates resistant to β -lactams such as methicillin and oxacillin (MRSA/ORSA isolates, respectively) [13], fluoroquinolone [14], and vancomycin [15]. In addition, biofilms have direct importance in the pathogenicity of *P. aeruginosa* and *S. aureus* [16].

The *Candida* genus is a heterogeneous group of yeasts that cause opportunistic infections in immunocompromised hosts; among the infections involving this genus,

approximately 90% are caused by *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* [17, 18]. *Candida* species resistant to diverse antifungals, such as azoles, echinocandins, and polyenes, have been reported [19], and the mechanisms involved include the decrease of intracellular drug concentration by the action of efflux pumps, drug target alterations and metabolic bypasses [20]. The relevance of biofilm formation in *Candida* infections has also been described [21].

Natural products comprise a diversity of bioactive molecules that have been evaluated as potential innovative therapeutic agents, playing an extremely important role in the discovery and development of new drugs [22]. Lectins are carbohydrate-binding proteins widely distributed in plants and exhibiting diverse biological activities, including antimicrobial action [23–25]. A lectin termed ApuL was isolated from the inflorescence bracts of *Alpinia purpurata* (Viell.) K. Schum. [26], which is an ornamental plant of the Zingiberaceae family, native to the Pacific islands, but currently cultivated on a large scale in several countries owing to its ability to bloom continuously throughout the year and the exuberance and durability of the flowers [27].

ApuL is an acidic and oligomeric protein of 34 kDa whose hemagglutinating activity is resistant to heat and is stimulated in the presence of calcium and magnesium ions. Brito et al. [26] reported that this lectin showed an interesting immunomodulatory effect with its ability to induce the release of nitric oxide and cytokines belonging to Th1 (IFN- γ , TNF- α , and IL-6) and Th17 (IL-17A) profiles; in addition, ApuL stimulated the differentiation and activation of both CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes.

This work aimed to evaluate the antibacterial activity of ApuL against *S. aureus* and *P. aeruginosa* (standard and antibiotic-resistant isolates) as well as its antifungal activity toward *Candida* species. Growth curves, protein leakage, and changes in cell ultrastructure were evaluated. In addition, we determined the effects of combinations of lectin and antibiotics on microbial growth and the ability of ApuL in inhibiting biofilm formation.

2. Materials and methods

2.1. Lectin isolation

Inflorescences were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), with authorization (number 36301) of the *Instituto Chico Mendes de*

Conservação da Biodiversidade (ICMBio) from the Brazilian Ministry of Environment. A voucher specimen was deposited under number 53,376 at the herbarium UFP Geraldo Mariz from the *Centro de Biociências* of the UFPE. ApuL was purified according to the protocol described by Brito et al. [26].

2.2. Protein concentration and hemagglutination assay

Protein concentrations of the samples were determined according to Lowry et al. [27] using bovine serum albumin as standard (31.25–500 µg/mL). The hemagglutinating activity (HA) was evaluated using a 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes [28]. The erythrocytes were collected through a protocol approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation from UFPE (process 23076.033782/2015-70). In the HA assay, the sample (50 µL) was diluted two-fold in 0.15 M NaCl in 96-well microplates and then 50 µL of the erythrocyte suspension was added to each well. Erythrocytes incubated with 0.15 M NaCl were used as controls. After 45 min, the HA was recorded as the reciprocal of the highest sample dilution that promoted hemagglutination. Specific HA corresponded to the ratio between the HA and the concentration of protein (mg/mL). A HA inhibitory assay was performed by incubating (15 min, 28°C) the lectin with 0.2 M fetuin or 0.2 M ovalbumin solution prior to the addition of the erythrocyte suspension.

2.3. Preparation of microbial inocula

Standard isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538) were provided by the culture collection (WDCM 114) of the *Departamento de Antibióticos* from UFPE. Multidrug-resistant isolates of *P. aeruginosa* (UFPEDA-261 and UFPEDA-262) and oxacillin-resistant *S. aureus* isolates (UFPEDA-670, UFPEDA-671 and UFPEDA-672) were also obtained from this collection. The isolation sites and resistance profiles of these isolates are shown in Table 1. Clinical isolates of the yeasts *Candida albicans* (URM 5901) and *Candida parapsilosis* (URM 6345) were obtained from the ‘University Recife Mycologia’ (URM) culture collection from the *Departamento de Micologia* of UFPE.

The stock cultures were maintained at -20°C in sterile nonfat milk powder with 10% (v/v) glycerol. Bacteria were cultured in Mueller Hinton Agar (MHA) overnight at 37°C and

yeasts were cultured in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) overnight at 28°C. For experimental use, the density of microorganism cultures was adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm (OD_{600}) to 10^6 or 10^8 colony forming units (CFU) per mL in sterile saline solution (0.15 M NaCl).

2.4. Determination of minimal inhibitory (MIC), minimal bactericidal (MBC) and minimal fungicidal (MFC) concentrations

MIC values for ApuL were determined using a microtiter assay, as proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute [29]. The assays were performed in 96-well microplates, where 80 μ L of sterile Milli-Q water was added from the third until the twelfth well of a row. Next, 80 μ L of ApuL (at 1000 μ g/mL) was added to the fourth well and a two-fold serial dilution was performed until the end of the row. Then, 40 μ L of culture medium [Mueller Hinton Broth (MHB) for bacteria or Sabouraud Dextrose Broth (SDB) for yeasts] was added to all wells of the microplate row except the first, which was filled with 200 μ L of the culture medium and served as sterility control. Antibiotics [ampicillin, tetracycline, oxacillin and ceftazidime (8 μ g/mL) for bacteria, and fluconazole (64 μ g/mL) for yeasts], obtained from Sigma-Aldrich (USA), were used as reference drugs in the second well. Finally, the microorganism suspension (80 μ L; 10^6 CFU/mL) was added from the second until the twelfth well. The third well (containing microorganism in the absence of the lectin) corresponded to the 100% growth control. The microplates were incubated at 37°C or 28°C for bacteria and yeasts, respectively. The OD_{600} was measured at time zero and after 24 h using a microplate reader. The MIC_{50} was defined as the lowest ApuL concentration able to promote a reduction of $\geq 50\%$ in the optical density, in comparison with the 100% growth control. MIC_{50} values were also determined for oxacillin, ceftazidime, and fluconazole.

For determination of the MBC and MFC, aliquots (10 μ L) from the wells containing lectin concentrations $\geq MIC_{50}$ were inoculated into petri plates containing MHA or SDA, which were then incubated for 24 h at 37°C or 28°C, respectively. The MBC and MFC corresponded to the lowest concentration able to reduce the number of CFU by 99.9% regarding the initial inoculum. Each assay was conducted in triplicate and three independent experiments were performed.

2.5. Microbial growth curves

The six-hour growth curves of the bacteria and yeasts, when exposed to different ApuL concentrations (0.25 to $2 \times \text{MIC}_{50}$) or in the absence of lectin (negative control), were established in a 96-well microtiter plate according to Gaidamashvili and Van Staden [30]. To each 80 μL of inoculum (10^6 CFU/mL) was added during the exponential growth phase plus 80 μL of ApuL at the cited concentrations and 40 μL of MHB or SDB. The plates were incubated at 37°C or 28°C and the OD_{600} was measured every hour.

2.6. Evaluation of protein leakage

The leakage of proteins from microbial cells was evaluated according to Ogundare [31]. The concentration of ApuL was adjusted to the MIC_{50} value for the respective isolate in a total volume of 1 mL corresponding to 900 μL of the medium (MHB or SDB) containing the lectin and 100 μL of the inoculum (10^6 CFU/mL). For negative controls, the lectin was replaced by distilled water. The assays were maintained in a shaking incubator at 37°C or 28°C for 24 h. After this period, the samples were centrifuged ($300 \times g$; 10 min, 25°C) and the supernatants were evaluated for protein concentration [27]. The amount of leaked protein was calculated by subtracting the protein content at time zero from the content at the end of assay. The assays were performed in quadruplicate.

2.7. Microscopy analysis

Three-dimensional images of the structure of microbial cells treated or not with ApuL were obtained by scanning electron microscopy (SEM). The microbial cells (1.2 mL; 10^6 CFU/mL) were incubated with MHB or SDB (0.6 mL) and ApuL (0.4 mL) at the respective MIC_{50} in Milli-Q water. The negative control was performed by adding Milli-Q water instead of lectin. After incubation (24 h at 37°C or 28°C), the samples were centrifuged ($300 \times g$; 10 min, 25°C) and the precipitated cells were washed three times in 0.1 M cacodylate buffer and fixed in 2.5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde/5 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 for 30 min at 28°C. After washing with the same buffer, the cells were allowed to adhere to stubs ($\varnothing$ 12.7 mm, 9 mm length; Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) and post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide/5 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. The cells were dehydrated in graded acetone, critical-point-dried

with CO₂, coated with a 20 nm-thick gold layer, and observed with a Quanta 200F (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) scanning electron microscope. Cells without treatment were used as controls.

2.8. Synergism assay

The synergistic effects between ApuL and antibiotics were evaluated using the method described by Pillai and Moellering [32]. Combinations of ApuL and oxacillin or ceftazidime were tested against antibiotic-resistant and standard *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolates, respectively, and with fluconazole against *Candida* species. The assay was performed in order to obtain a range of concentrations of ApuL and commercial drugs that would allow simultaneous detection of synergism, addition, indifference or antagonism. Each experiment corresponded to two rows of a 96-well microplate, where the antibiotic was added (80 µL at $8 \times \text{MIC}_{50}$) to the fourth well of the first row and serial two-fold dilution in sterile Milli-Q water was performed until the penultimate well of the second row. Next, ApuL was added (80 µL at $4 \times \text{MIC}_{50}$) to the penultimate well of the second row and two-fold serial dilution was carried out in the opposite direction until the fourth well of the first row. The third well of the first row contained only the drug ($4 \times \text{MIC}_{50}$) and the last well of the second row contained only ApuL ($4 \times \text{MIC}_{50}$), while the intermediate wells contained mixtures of the two agents at different ratios. MHB or SDB (40 µL) was added to all wells of the plate and to the first well which contained 200 µL of culture medium and corresponded to a sterility control. The second well corresponded to the 100% growth control. Each plate was inoculated with microbial suspension (80 µL at 10^6 CFU/mL) and incubated at 37°C or 28°C for 24 h.

The evaluation of the interaction between the different treatments was performed by determining the fractional inhibitory concentration index (FICI), as follows: $\text{FICI} = (\text{MIC}_{50} \text{ of ApuL in combination} / \text{MIC}_{50} \text{ of ApuL alone}) + (\text{MIC}_{50} \text{ of antibiotic in combination} / \text{MIC}_{50} \text{ of antibiotic alone})$. The combinations were classified as synergistic ($\text{FICI} \leq 0.5$), additive ($0.5 < \text{FICI} \leq 1$), indifferent ($1 < \text{FICI} \leq 2$) or antagonistic ($\text{FICI} > 2$).

2.9. Antibiofilm assay

Biofilm formation was assessed in sterile 96-well microplates by the crystal violet method [33] and the ability of ApuL in preventing or reducing the biofilm formation was

determined. In the assay, 80 μ L of microbial suspension (10^8 CFU/mL in 0.15M NaCl), 80 μ L of ApuL (at different concentrations based on MIC₅₀ for each microorganism) in Milli-Q water, and 40 μ L of MHB or SDB were added to each well. Milli-Q water was used in place of ApuL in 100% biofilm formation controls (non-treated cells). Bacterial growth was assessed by following the increase in OD₆₀₀ after 24 h of incubation at 37°C or 28°C. Next, non-adherent cells were removed from the wells by washing three times with 0.15 M NaCl. The biofilms were fixed with absolute methanol solution for 20 min, heat-fixed at 50°C for 60 min, and then stained with 0.4% (w/v) crystal violet for 25 min at 25°C. The unbound crystal violet was removed with distilled water, the dye that bound to the biofilm was solubilized with absolute ethanol (15 min), and absorbance was measured at 570 nm. All experiments were performed in triplicate. Ampicillin, oxacillin, and fluconazole (at MIC₅₀ value) were used as reference drugs.

2.10. Statistical analysis

The data were expressed as the mean or the percent mean $\pm$ standard deviation (SD) and statistical differences were determined using Tukey's range test; a *p* value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

In view of the increasing need for new antimicrobial agents, plant lectins have been evaluated for antibacterial and antifungal activities; in addition, the mechanisms of action have been studied. The present work reports the investigation of antimicrobial action of the lectin ApuL against non-resistant and drug-resistant pathogens as well as possible synergistic effects with antibiotic supplementation.

ApuL was isolated by gel-filtration chromatography on Sephadex G-75 columns and showed specific HA of 195 with a purification factor of 12.4. The HA ability of ApuL was inhibited by the glycoproteins fetuin and ovalbumin. All of these results corroborate with data previously reported by Brito et al. [26].

ApuL showed bacteriostatic activity against the non-resistant (ATCC-6538) and one (UFPEDA-672) of the three oxacillin-resistant isolates of *S. aureus* (Table 2). A lower MIC₅₀ value was obtained for the non-resistant isolate, which was also the only one for which

bactericidal activity was detected (MBC of 200 µg/mL). For *P. aeruginosa* isolates, ApuL did not present bacteriostatic or bactericidal effects at the tested concentrations. The lectin showed fungistatic activity against *C. albicans* and *C. parapsilosis* (Table 1) and was also able to kill both yeasts with MFC of 400 µg/mL.

The antimicrobial effects of lectins may involve their interaction with microbial cell wall components such as teichoic and teicuronic acids, peptidoglycans and lipopolysaccharides present in gram-positive and gram-negative bacteria [34]. These proteins may also bind to chitin, chitin oligomers, cellulose and other saccharides in fungal cell walls [35]. The binding of lectins to these components and the access of them to membrane surfaces may trigger several effects such as growth inhibition, damage to cellular integrity, alteration to membrane permeability and nutrient uptake, induction of oxidative stress, and damage to respiratory processes, for example [25, 36]. Additionally, lectins can also enter fungal cells and block enzymes involved in the synthesis of wall polymers [37].

ApuL showed differential action on the gram-positive and gram-negative species evaluated, as well as exerting distinct effects on non-resistant and resistant isolates of the same species. This may be explained because, as mentioned above, the antibacterial activity of lectins is linked to their interaction with carbohydrates at microbial surfaces, which may be different among distinct isolates of the same bacterium [38]. Indeed, the amplitude of the spectra of action differs among lectins. ClaveLL, a lectin isolated from *Cladonia verticillaris* lichen, presented antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *S. aureus*) [39] and lectin from *Eugenia malaccensis* showed high bacteriostatic and bactericidal effects against several species, being more effective against *S. aureus* [40]. On the other hand, the lectin from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae (CasuL) showed bacteriostatic activity against gram-positive *Staphylococcus saprophyticus* and *S. aureus* but was not active on gram-negative *E. coli* [36].

Klafke et al. [41] reported the antifungal activity of six plant lectins against *C. parapsilosis*, with MIC and MFC ranging from 0.97 to > 500 µg/mL. The lectin from *Helianthus annuus* seedlings showed significant inhibitory effects against *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* and *Pichia membranifaciens* [42]. The lectin CasuL was active against *C. krusei* with MIC and MFC of 125 and 250 µg/mL, respectively [36]. The values detected for ApuL are within the range of active concentrations reported in these studies.

As mentioned previously, ApuL demonstrated different bacteriostatic efficacy for standard and resistant (UFPEDA-672) *S. aureus* isolates. Therefore, we studied the growth of microbial cells in MHB over 6 h, in the absence and presence of lectin, and the growth curves are shown in Figure 1. For both isolates, there was no significant difference in the optical density for ApuL-treated and untreated cultures in the first four hours after incubation. Growth inhibition by ApuL (not so clearly a dose-dependent effect) was detectable after 5 h. The growth rate of *S. aureus* standard cells was reduced by 30–40% after six hours of ApuL treatment (0.25 to 2× MIC₅₀ values; Figure 1A). The same concentrations of ApuL exhibited lower activity against *S. aureus* UFPEDA-672, with 20–25% reduction after 6 h (Figure 1B). Based on these results, we can conclude that the bacteriostatic effect of ApuL against both isolates cannot be evidenced within a few hours of incubation. For *Candida* isolates, a low growth level was detected over the six hours of incubation, but this period was sufficient in revealing initial evidences of the fungistatic effect of ApuL (Figure 1C and 1D).

Moura et al. [43] suggested that lectin pore-forming mechanisms are involved in the antibacterial activity of lectin from *Moringa oleifera* seeds, based on the detection of protein leakage and cell membrane damage. We investigated a possible effect of ApuL at the membrane level by evaluating protein leakage. ApuL at MIC₅₀ promoted protein leakage from *S. aureus* UFPEDA-672 (Figure 1B, inset), *C. albicans* (Figure 1C, inset) and *C. parapsilosis* (Figure 1D, inset) cells after 24 h in comparison to the negative control cells. However, for the non-resistant *S. aureus* isolate (Figure 1A, inset), there was no significant difference between treatments (negative controls and ApuL-treated cells), in spite of the fact that this bacterium was the most sensitive microorganism. These results suggested different modes of action of the lectin against the tested isolates.

Three-dimensional structures of bacterial and fungal cells treated with ApuL at MIC₅₀ were studied by SEM (Figure 2). The images obtained for non-resistant *S. aureus* isolate cells showed almost no differences between the controls (Figure 2A) and the cells after treatment (Figure 2B). However, we can observe that ApuL may have induced bacterial cell-cycle arrest, since some cells appear not to have completed cell division. Against the resistant isolate UFPEDA-672, the lectin also did not cause serious damage to the bacterial structure, but the treated cells presented prominences on their surfaces without alteration of cell morphology. These results reinforced the idea that ApuL acts in different ways on *S. aureus* isolates: there was no protein leakage and structural damage on non-resistant cells, but cell

division seemed to be impaired, whereas for the UFPEDA-672 isolate, changes involving cell surfaces and membranes occurred, with structural alterations and protein leakage.

For *Candida* species, damage occurred in almost all cells when compared to the control (Figure 2E and 2G). All treated-cells of *C. albicans* (Figure 2F) and *C. parapsilosis* (Figure 2H) exhibited malformations with elongations and bulges, with the presence of cellular fragments. These alterations revealed a probable loss of cellular integrity, which may have affected the cellular growth and development.

Studies have proposed that the antibacterial effect of lectins includes the ability to promote changes in cell membranes, such as pore formation that leads to alterations in permeability [43, 44]. A recent study showed that CasuL at MIC caused cell wall damage to *C. krusei* with the presence of ruptured cells and cellular debris. Additionally, the authors also observed incomplete cell division [36]. Cell wall discontinuities and prominences were also observed by Santi-Gadelha et al. [44] studying the antibacterial action of *Acacia farnesiana* lectin against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* and reported action at the membrane level.

The results from our investigation of the combinatorial effects of ApuL with standard drugs are shown in Table 2. Oxacillin and ceftazidime were chosen for this test according to the resistance profile of the isolates of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Fluconazole, an antifungal drug commonly used for the treatment of candidiasis, was selected for assays with *C. albicans* and *C. parapsilosis*. For the isolates in which bacteriostatic effects were not detected, a MIC value $> 400 \mu\text{g/mL}$ was considered in the calculations. The combination of ApuL-oxacillin displayed synergism against resistant *S. aureus* UFPEDA-670 and UFPEDA-671, revealing that ApuL alone was not able to inhibit their growth, and was highly effective in reducing the MIC₅₀ of the oxacillin. An additive effect was detected for the non-resistant *S. aureus* isolate, with the antibiotic potentiating the lectin effect. For the isolate UFPEDA-672, the combination showed an indifferent effect, since there was a potentiating of lectin activity but, conversely, the antibiotic action was impaired.

Synergistic action was observed for the combination of ApuL and ceftazidime against *P. aeruginosa* isolate UFPEDA-262, and this combination also revealed additive action against the non-resistant isolate, potentiating the action of lectin (Table 2). Conversely, for *P. aeruginosa* isolate UFPEDA-261, the combinatorial effect could not be calculated since the MIC₅₀ for both compounds in combination could not be determined, indicating the high resistance of this bacterium to both ApuL and ceftazidime. The combination of ApuL-

fluconazole exhibited additive and synergistic properties against *C. albicans* and *C. parapsilosis*, respectively (Table 2). The synergic effect on *C. parapsilosis* corresponded to a reduction greater than 8-fold of the MIC₅₀ for fluconazole, which is very interesting.

Combination therapy is the most commonly recommended treatment against microbial infections in intensive care units, since not all pathogens are sensitive to monotherapy [45]. The use of natural products and synthetic antibiotics combined has increased for strategic control of resistant microorganisms [46]. A study developed by Knezevic et al. [47] using essential oils from *Eucalyptus camaldulensis* in combination with the antibiotic polymixin B showed synergistic effects against some multi-drug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. Blesson et al. [48] demonstrated a strong synergistic activity of aqueous leaf extract from *Colocasia esculenta* in combination with gentamicin against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Curcumin, a natural polyphenolic flavonoid isolated from the rhizome of *Curcuma longa*, reduced the MIC of several antibiotics, including oxacillin, ampicillin, ciprofloxacin and norfloxacin against MRSA [49]. The synergistic effects involving alkaloids and fluconazole against resistant *Candida* species have also been reported [50, 51].

Biofilm formation is involved in several types of human infections, such as urinary, endocarditis, cystic fibrosis, dental plaque and many others disorders [52]. The biofilm development phases include attachment of cells to a surface, formation of microcolonies, development of nascent biofilm, differentiation of structured mature biofilm, and dispersal of mature biofilm [53]. The eradication of mature biofilms with conventional antibiotic therapy *in vivo* is almost impossible due to the high drug concentration necessary for effectiveness, increasing the toxicity and side effects on human health [53, 54]. In this way, the first stage of biofilm development, which involves the adhesion and formation of microcolonies, is the most attractive to control biofilm-associated infections [9, 55]. In this sense, we investigated the capacity of ApuL to impair biofilm development by the microorganisms for which we had determined the MIC₅₀ (*S. aureus* non-resistant and oxacillin-resistant UFPEDA-672 isolates, *C. albicans* and *C. parapsilosis*).

Growth and biofilm formation by non-resistant *S. aureus* cells were significantly ($p < 0.05$) reduced by 32–85% and 50–60%, respectively, after ApuL treatment in a range of 1.56–50 µg/mL, in comparison to non-treated cells (Figure 3A). ApuL (12.5 to 400 µg/mL) and the antibiotic agent (0.031 µg/mL) did not present any inhibitory effect against biofilm formation by *S. aureus* UFPEDA-672 (Figure 3B). Significant inhibition of biofilm development was observed for *C. albicans* at all concentrations evaluated (Figure 3C). This inhibition was up to

70%. On the other hand, for *C. parapsilosis*, this activity was minimal, not exceeding 25% inhibition after ApuL treatment (Figure 3D). Fluconazole (0.25 µg/mL) presented a strong (76%) capacity to block biofilm formation by *C. albicans* but, at 128 µg/mL, presented only weak ability to prevent biofilm formation by *C. parapsilosis*, similar to that which was observed for the lectin. The antibiofilm activity of lectins may involve the ability of these molecules to alter cell viability, interact with constituents present in the exopolymeric matrix of the biofilm, interrupting polymerization, and inhibiting quorum-sensing signals [9, 56].

Other natural products have already been tested and presented the capacity of blocking biofilm development [24, 25, 55]. The lectin CasuL impaired biofilm formation by *S. aureus* (non-resistant and oxacillin resistant isolates) and *S. saprophyticus* after 24 h of treatment [36]. Jayanthi et al. [57] described that the lectin from hemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and its Ag-nanoparticles-conjugated form decreased the quantity of extracellular polymeric substances produced by biofilm cells, disturbing the biofilm architecture and inhibiting the growth of *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus pumilus* in a dose-dependent manner.

In summary, the present study showed that ApuL presents different effects against non-resistant and oxacillin-resistant isolates of *S. aureus*, as well as antifungal activity against *Candida*. Evaluation of growth curves, protein leakage and ultrastructural changes suggested distinct mechanisms of action by ApuL. This lectin also exhibited synergistic action in combination with oxacillin and fluconazole toward oxacillin-resistant *S. aureus* isolate and *C. parapsilosis*, respectively. In addition, antibiofilm effects were detected for certain isolates.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowship (LCBBC, DMAFN, PMGP and THN), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. GRSF would like to thank CNPq for graduate scholarship. NDLS and MCM would like to thank CAPES for post-doctoral scholarships. The authors also thank Carlos Eduardo Sales da Silva for technical assistance.

References

- [1] C.L. Ventola, The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats, *Pharm. Therap.* 40 (2015) 277–283.
- [2] T. Bollenbach, Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution, *Current Opin. Microbiol.* 27 (2015) 1–9.
- [3] M. Madigan, J. Martinko, P. Dunlap, D. Clark, *Microbiologia de Brock*. 12th ed., Artemed, Porto Alegre, 2010.
- [4] X.Z. Li, P. Plésiat, H. Nikaido, The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram negative bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2015) 337-418.
- [5] M. Starkey, F. Lepine, D. Maura, A. Bandyopadhyaya, B. Lesic, J. He, T. Kitao, V. Righi, S. Milot, A. Tzika, L. Rahme, Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity, *PLoS Pathogens* 10 (2014) e1004321.
- [6] A.A. Nash, R.G. Dalziel, J.R. Fitzgerald, *Mims' pathogenesis of infectious disease*. 6th ed. Academic Press, New York, 2015.
- [7] A.C.M. Reis, J.O. Silva, B. Laranjeira, A.Q. Pinheiro, C.B.M. Carvalho, Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts, *Braz. J. Microbiol.* 45 (2014) 647-650.
- [8] H.J. Wu, A.H.J. Wang, M.P. Jennings, Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 93-101.
- [9] M.C. Moura, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Bacterial biofilms: structure, development and potential of plant compounds for alternative control, in: L.V. Berhardt (Ed.), *Advances in Medicine and Biology*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2017, pp. 1-34.
- [10] M. Berrazeg, K. Jeannot, V.Y.N. Enguéné, I. Broutin, S. Loeffert, D. Fournier, P. Plésiat, Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 6248-6255.
- [11] S.L. Gellatly, R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses, *Pathogens Dis.* 67 (2013) 159-173.

- [12] S.Y.C. Tong, J.S. Davis, E. Eichenberger, T.L. Holland, V.G. Fowler Jr., *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, Clin. Microbiol. Rev. 28 (2015) 603-661.
- [13] M.E. Stryjewski, G.R. Corey, Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen, Clin. Infect. Dis. 58 (2014) S10-S19.
- [14] L.S. Redgrave, S.B. Sutton, M.A. Webber, L.J.V. Piddock, Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success, Trends Microbiol. 22 (2014), 438-445.
- [15] S. Gardete, A. Tomasz, Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Investig. 124 (2014) 2836-2840.
- [16] A. Resch, S. Leicht, M. Saric, L. Pásztor, A. Jakob, F. Götz, A. Nordheim, Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling, Proteomics 6 (2006) 1867-1877.
- [17] J.C.O. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A.M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes-Gianini, *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, J. Med. Microbiol. 62 (2013) 10-24.
- [18] N. Papon, V. Courdavault, M. Claster, R.J. Bennet, Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm, PLoS Pathogens 9 (2013) e1003550.
- [19] C. Spampinato, D. Leonardi, D., *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents, Biomed Res. Int. 2013 (2013) 204237.
- [20] D. Sanglard, Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. Front. Med. 3 (2016) 11.
- [21] C.J. Seneviratne, L. Jin, L.P. Samaranayake, Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review, Oral Dis. 14 (2008) 582-590.
- [22] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, J. Nat. Prod. 75 (2012) 311-335.
- [23] R.O. Dias, L.S. Machado, L. Migliolo, O.L. Franco, Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities, Molecules 20 (2015) 519–541.
- [24] M.C. Moura, D.S. Trentin, T.H. Napoleão, M. Primon-Barros, A.S. Xavier, N.P. Carneiro, P.M.G. Paiva, A.J. Macedo, L.C.B.B. Coelho, Multi-effect of the water-soluble

- Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties, J. Appl. Microbiol. 123 (2017) 861-874.
- [25] T.F. Procópio, M.C. Moura, L.P. Albuquerque, F.S. Gomes, N.D.L. Santos, L.C.B.B. Coelho, E.V. Pontual, T.H. Napoleão, Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential, in: E. Collins (Ed.) Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities, Nova Science Publishers Inc., New York, 2017, pp. 69-89.
- [26] J.S. Brito, G.R.S. Ferreira, E. Klimczak, L. Gryshuk, N.D.L. Santos, L.L.S. Patriota, L.R. Moreira, A.K.A. Soares, B.R. Barbosa, P.M.G. Paiva, D.M.A.F. Navarro, V.M.B. Lorena, C.M.L. Melo, M.C. Coriolano, T.H. Napoleão, Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation, Biomed. Pharmacother. 94 (2017) 865-872.
- [27] C.P. Victório, S.G. Leitão, C.L.S. Lage, Chemical composition of the leaf oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith and *A. purpurata* (Vieill) K. Schum. from Rio de Janeiro, Brazil, J. Essential Oil Res. 22 (2010) 52-54.
- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951), 265–275.
- [28] D.H. Bing, J.G. Weyand, A.B. Stavinsky, A.B., Hemagglutination with aldehydes-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. USA 124 (1967) 1166–1170.
- [29] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement (M100–S22), Wayne, PA: CLSI, 2012.
- [30] M. Gaidamashvili, J. Van Staden, Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, J. Ethnopharmacol. 80 (2002) 131–135.
- [31] A.O. Ogundare, The pattern of potassium and protein leakage from microbial cells by *Vernonia tenoreana* leaf extract, Int. J. Trop. Med. 1 (2006) 100–102.
- [32] S.K. Pillai, R.C. Moellering, G.M. Eliopoulos, Antimicrobial combinations, in: V. Lorian (Ed.), Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th ed, The Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, 2005, pp. 365-440.

- [33] D.S. Trentin, R.B. Giordani, K.R. Zimmer, A.G. Silva, M.V. Silva, M.T.S. Correia, I.J.R. Baumvol, A.J. Macedo, Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 327–335.
- [34] P.M.G. Paiva, F.S. Gomes, T.H. Napoleão, R.A. Sá, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants, in: A. Mendez-Villas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology*, Formatex Research Center, Badajoz, 2010, pp. 396-406.
- [35] Q. Yao, C-F. Wu, P. Luo, X-C. Xiang, J-J. Liu, L. Mou, J-K. Bao, A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities, *Process Biochem.* 45 (2010) 1477-1485.
- [36] T.F. Procópio, L.L.S. Patriota, M.C. Moura, P.M. Silva, A.P.S. Oliveira, L.V.N. Carvalho, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, L.C.B.B. Coelho, M.G.R. Pitta, M.J.B.M. Rego, R.C.B.Q. Figueiredo, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 419-429.
- [37] A.F.S. Santos, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Lectins: important tools for biocontrol of *Fusarium* species, in: T.F. Rios, E.R. Ortega (Eds.), *Fusarium*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012, pp. 161-175.
- [38] B. Islam, S.N. Khan, A. Naeem, V. Sharma, A.U. Khan, Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface, *J. Appl. Microbiol.* 106 (2009) 1682-1689.
- [39] D.B.M. Ramos, F.S. Gomes, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, M.D.C. Silva, L.C.B.B. Coelho, Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance, *Chinese J. Biol.* 2014 (2014) 219392.
- [40] V.P. Brustein, F.V. Souza-Araújo, A.F.M. Vaz, R.V.S. Araújo, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, A.M.A. Carneiro-Leão, J.A. Teixeira, J.A., M.G. Carneiro-da-Cunha, M.T.S. Correia, A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model, *Inflammopharmacol.* 20 (2012) 315-322.
- [41] G.B. Klafke, G.M.S.G. Moreira, L.G. Monte, J.L. Pereira, T.M. Brandolt, M.O. Xavier, T. Santi-Gadelha, O.A. Dellagostin, L.S. Pinto, Assessment of plant lectin antifungal

- potential against yeasts of major importance in medical mycology, *Mycopathologia* 175 (2013) 147-151.
- [42] M. Regente, G.B. Taveira, M. Pinedo, M.M. Elizalde, A.J. Ticchi, M.S.S. Diz, A.O. Carvalho, L. Canal, V.M. Gomes, A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications, *Current Microbiol.* 69 (2014) 88-95.
- [43] M.C. Moura, T.H. Napoleão, M.C. Coriolano, P.M.G. Paiva, R.C.B.Q. Figueiredo, L.C.B.B. Coelho, Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 119 (2015) 666-676.
- [44] T. Santi-Gadelha, B.A.M. Rocha, C.A.A. Gadelha, H.C. Silva, R.E.R. Castellon, F.J.T. Gonçalves, D.O. Toyama, M.H. Toyama, A.J.F. Souza, L.O.S. Beriam, J.L. Martins, P.P. Joazeiro, B.S. Cavada, Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial isolates and root-knot nematod,. *Pest. Biochem. Physiol.* 103 (2012) 15–22.
- [45] D-J. Joung, O-H. Kang, Y-S. Seo, T. Zhou, Y-S. Lee, S-H. Han, S-H. Mun, R. Kong, H-J. Song, D-W. Shin, D-Y. Kwon, Luteolin potentiates the effects of aminoglycoside and β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*, *Exp. Ther. Med.* 11 (2016) 2597-2601.
- [46] S. Hemaiswarya, A.K. Kruthiventi, M. Doble, Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases, *Phytomedicine* 15 (2008) 639-652.
- [47] P. Knezevic, V. Aleksic, N. Simin, E. Svircev, A. Petrovic, N. Mimica-Dukic, Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, *J. Ethnopharmacol.* 178 (2016) 125-136.
- [48] J. Blesson, C.V. Saji, R.M. Nivya, R. Kumar, Synergistic antibacterial activity of natural plant extracts and antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4 (2015) 741-763.
- [49] S-H. Mun, D-K. Joung, Y-S. Kim, O-H. Kang, S-B. Kim, Y-S. Seo, Y-C. Kim, D-S. Lee, D-W. Shin, K-T. Kweon, D-Y. Kwon, Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Phytomedicine* 20 (2013) 714-718.
- [50] L.P. Li, W. Liu, H. Liu, F. Zhu, D.Z. Zhang, H. Shen, Z. Xu, Y.P. Qi, S.M. Chen, L.J. He, X.J. Cao, X. Huang, J.D. Zhang, L. Yan, M.M. An, Y.Y. Jiang, Synergistic

- antifungal activity of berberine derivative B-7b and fluconazole, PLoS ONE 10 (2015) e0126393.
- [51] B. Pippi, A.J.D. Lana, R.C. Moraes, C.M. Güez, M. Machado, L.F.S. Oliveira, G.L. von Poser, A.M. Fuentefria, *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp., J. Appl. Microbiol. 118 (2015) 839-850.
- [52] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, H.O. Sintim, Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents, Fut. Med. Chem. 7 (2015) 493–512.
- [53] H. Wu, C. Moser, H-Z. Wang, N. Hoiby, Z-J. Song, Strategies for combating bacterial biofilm infections, Int. J. Oral Sci. 7 (2015) 1–7.
- [54] W. Hengzhuang, H. Wu, O. Ciofu, Z. Song, N. Høiby, *In vivo* pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection, Antimicrob. Agents Chemother. 56 (2012) 2683–2690.
- [55] D.S. Trentin, D.B. Silva, A.P. Frasson, O. Rzhepishevskaya, M.V. Silva, E.L. Pulcini, G. James, G.V. Soares, T. Tasca, M. Ramstedt, R.B. Giordani, N.P. Lopes, A.J. Macedo, Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria, Sci. Rep. 5 (2015) 1–10.
- [56] T.T.A. Cavalcante, V.A. Carneiro, C.C. Neves, H.S. Duarte, M.G.Q. Martins, F.V.S. Arruda, M.A. Vasconcelos, H.S. Santos, R.M.S. Cunha, B.S. Cavada, E.H. Teixeira, 2013. A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*, Adv. Biosci. Biotechnol. 4 (2013) 1073–1078.
- [57] S. Jayanthi, R. Ishwarya, M. Anjugam, A. Iswarya, S. Karthikeyan, B. Vaseeharan, Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties, Fish Shellfish Immunol. 62 (2017) 227-237.

Figure captions

Figure 1. Growth curves (6 h incubation) and protein leakage (insets) from cells of *Staphylococcus aureus* non-resistant isolate ATCC-6538 (A) and oxacillin-resistant isolate UFPEDA-672 (B) as well as of the yeasts *Candida albicans* (C) and *Candida parapsilosis* (D), in the absence (negative control) and presence of *Alpinia purpurata* inflorescence lectin (ApuL). Leakage of proteins was evaluated after 24 h of incubation. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments in triplicate. (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$).

Figure 2. Scanning electron microscopy of microbial cells after exposure to ApuL at the MIC₅₀. Control (a, c, e, g) and ApuL-treated (b, d, f, h) cells of *Staphylococcus aureus* non-resistant isolate (a, b), *Staphylococcus aureus* oxacillin-resistant isolate UFPEDA-672 (c, d), *Candida albicans* (e, f) and *Candida parapsilosis* (g, h) can be observed. *S. aureus* non-resistant cells showed almost no difference between the control and treatment, but some treated cells appear not to have completed cell division, as indicated by arrows (b). The resistant isolate 672 presented prominences on cell surfaces without alteration of morphology (d). Treated *C. albicans* (f) and *C. parapsilosis* (h) cells exhibited malformations with elongations (arrow) and bulges (arrowhead), and presence of cellular fragments.

Figure 3. Antibiofilm activity of ApuL against *Staphylococcus aureus* non-resistant (ATCC-6538) and oxacillin-resistant (UFPEDA-672) isolates, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. The cells were treated for 24 h with sub-inhibitory concentrations until the MIC₅₀ for each isolate. The bacterial growth and biofilm formation were determined by measuring optical density at 600 nm and by the crystal violet method, respectively. Non-treated cells corresponded to the negative control. (*) indicates statistical difference ($p < 0.05$) between the treatments and negative control, as analyzed by Student's *t*-test.

Figure 1

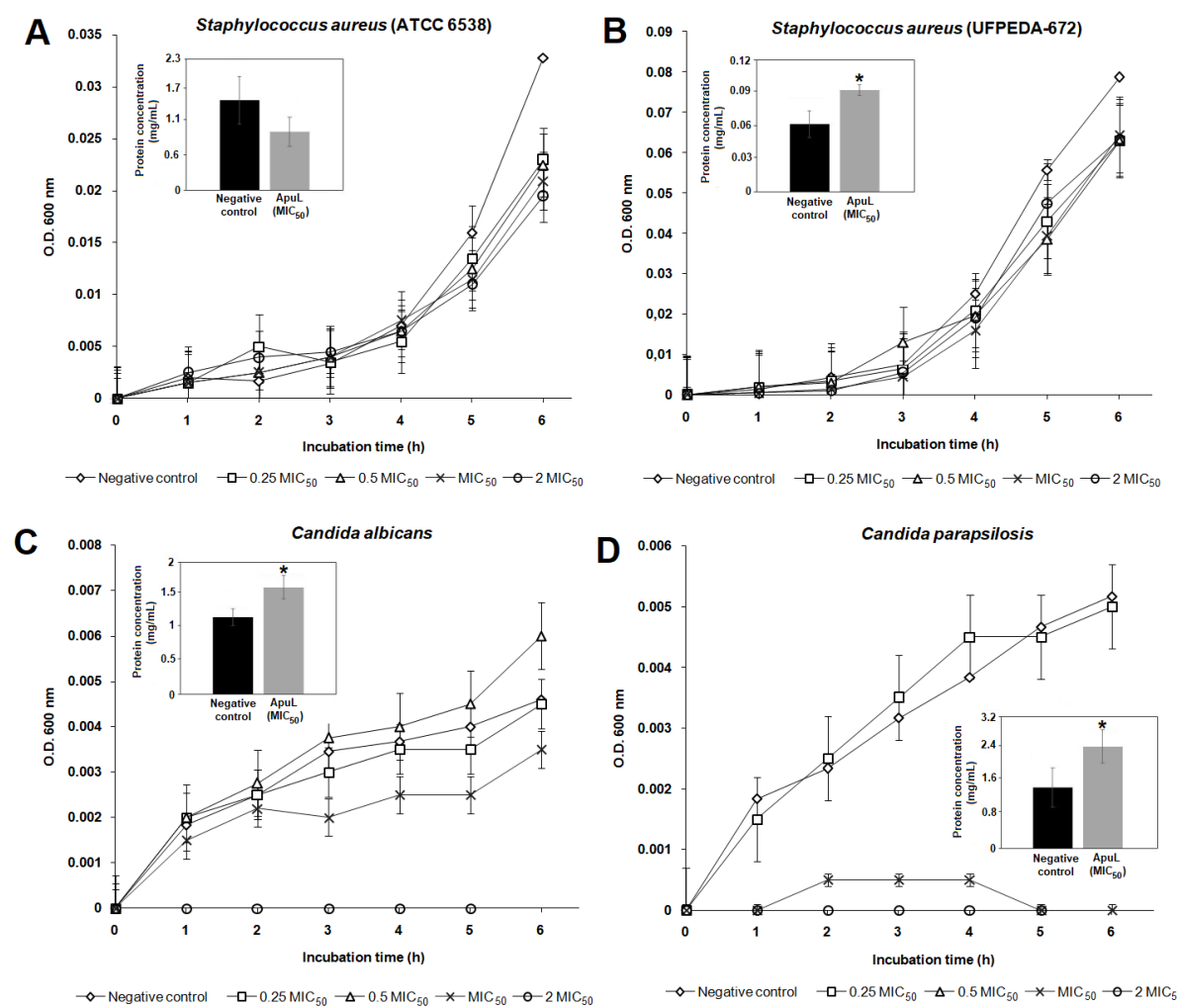


Figure 2

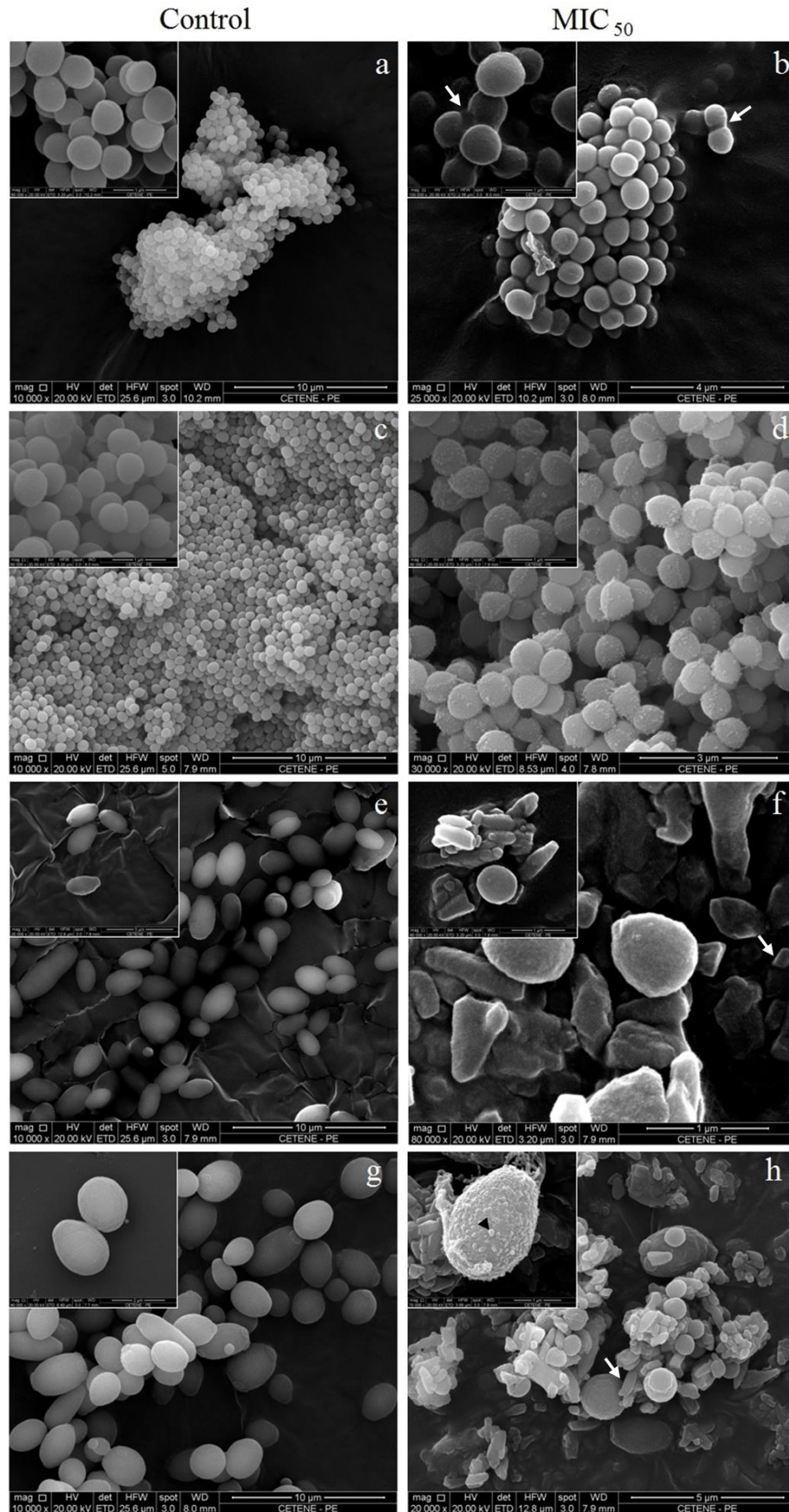


Figure 3

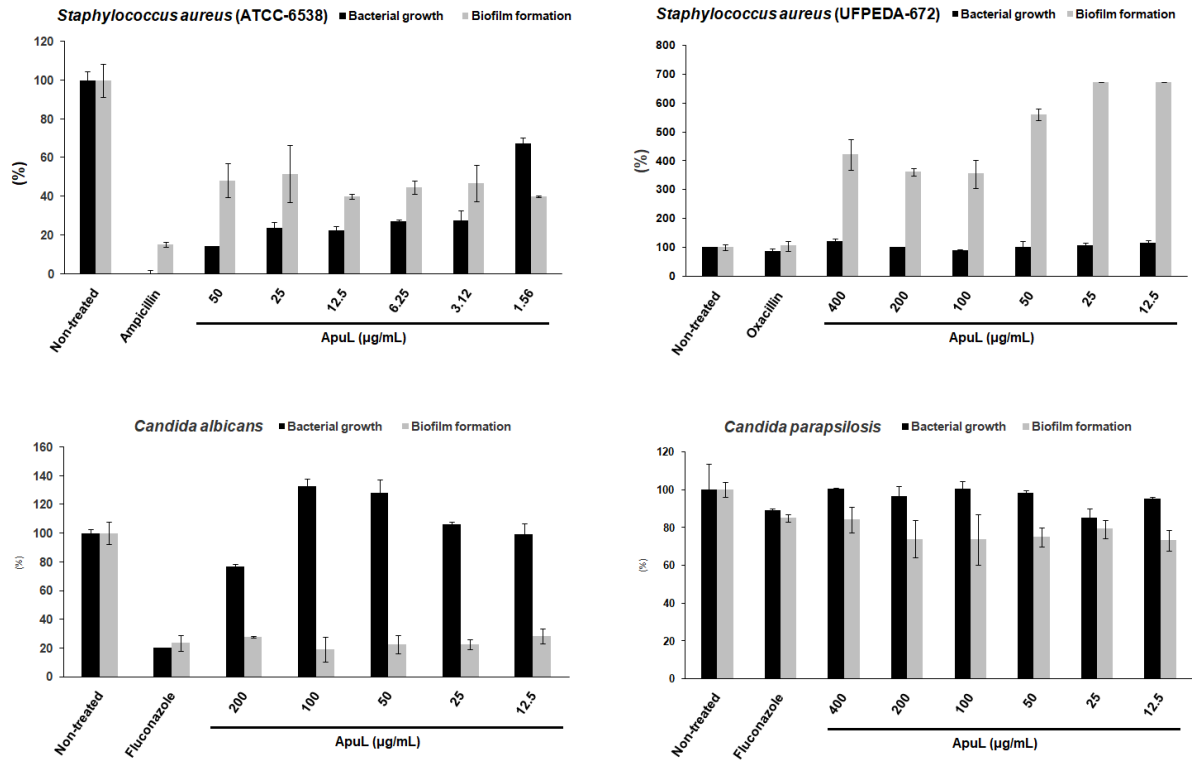


Table 1. Isolation sites of the bacterial clinical isolates used in this work and commercial antibiotics to which they are resistant.

Species	Isolate	Isolation site	Resistance profile
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPEDA-261	Operative wound	Aztreonam, gentamicin, imipenem, ceftazidime, ticarcillin + clavulanic acid, piperacillin + tazobactam, and cefepime
	UFPEDA-262	Ulcer secretion	Meropenem, imipenem and ceftazidime
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA-670	Uroculture	Oxacillin
	UFPEDA-671	Uroculture	Oxacillin
	UFPEDA-672	Blood culture	Oxacillin

Table 2. Evaluation of antimicrobial activity of ApuL and reference drugs (separated or in combination) against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC ₅₀		MIC ₅₀ in combination		FICI ^a	Effect of combination ^b
	ApuL	Oxacillin	ApuL	Oxacillin		
ATCC-6538	50	0.031	6.6×10^{-4}	0.031	1	Additive
UFPEDA-670	>400	0.25	50	7.7×10^{-6}	0.12	Synergism
UFPEDA-671	>400	0.25	0.125	0.003	0.5	Synergism
UFPEDA-672	400	0.031	7.63×10^{-4}	0.062	2	Indifferent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC ₅₀		MIC ₅₀ in combination		FICI ^a	Effect of combination ^b
	ApuL	Ceftazidime	ApuL	Ceftazidime		
ATCC-27853	>400	2	0.002	2	1	Additive
UFPEDA-261	>400	>32	ND	ND	NC	---
UFPEDA-262	>400	4	0.003	2	0.5	Synergism
<i>Candida</i> species	MIC ₅₀		MIC ₅₀ in combination		FICI ^a	Effect of combination ^b
	ApuL	Fluconazole	ApuL	Fluconazole		
<i>Candida albicans</i>	200	0.25	0.003	0.25	1	Additive
<i>Candida parapsilosis</i>	400	>128	0.004	16	0.12	Synergism

MIC₅₀: minimal inhibitory concentration, expressed in µg/mL. FICI: fractional inhibitory concentration index. ND: not determined. NC: not calculated.

4. CONCLUSÃO

- Efeito bacteriostático de ApuL foi observado frente isolados de *Staphylococcus aureus* não resistente e resistente à oxacilina, com menor CMI₅₀ obtido frente a cepa não resistente, para a qual a lectina também apresentou efeito bactericida.
- ApuL não apresentou ação frente a isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Ações fungistática e fungicida da lectina foi observada frente espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. parapsilosis*).
- ApuL promoveu o extravasamento de proteínas intracelulares de *S. aureus* resistente à oxacilina, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.
- Imagens de microscopia de varredura revelaram que ApuL causou modificações morfológicas nas células de *S. aureus* e *Candida*.
- A combinação ApuL-oxacilina apresentou efeito sinérgico frente *S. aureus* resistente a esse antibiótico e aditivo frente *S. aureus* não resistente.
- A combinação ApuL-ceftazidima apresentou efeito sinérgico frente *P. aeruginosa* multirresistente e aditivo frente *P. aeruginosa* não-resistente.
- A combinação ApuL-fluconazol apresentou efeito aditivo frente *C. albicans* e sinérgico frente *C. parapsilosis*.
- ApuL apresentou efeito antibiofilme *in vitro* frente células de *S. aureus* não resistente.
- O desenvolvimento de biofilmes por *C. albicans* e *C. parapsilosis* foi inibido após tratamento com a lectina.

REFERÊNCIAS

- ABREU, T.M., RIBEIRO, N.A., CHAVES, H.V., JORGE, R.J., BEZERRA, M.M., MONTEIRO, H.S., VASCONCELOS, I.M., MOTA, E.F., BENEVIDES, N.M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the lectin from marine red alga *Solieria filiformis*. **Planta Med**, v. 82, n. 7, p. 596-605, 2016.
- AKKOUH, O., NG, T.B., SINGH, S.S., YIN, C., DAN, X. CHAN, Y.S., PAN, W., CHEUNG, R.C.F. Lectins with anti-HIV activity: A review. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 648-688, 2015.
- ALVAREZ-ORTEGA, C., WIEGAND, I., OLIVARES, J., HANCOCK, R.E.W., MARTÍNEZ, J.L. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactamics antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4159-4167, 2010.
- ATHANASSA, Z., SIEMPOS, II., FALAGAS, M.E. Impact of methicilin resistance on mortality in *Staphylococcus aureus* VAP: a systematic review. **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 3, p. 625-632, 2008.
- BECEIRO, A., TOMÁS, M., BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.
- BERMUDÉZ, A., VELÁZQUEZ, D. Etnobotanica medica de una comunidad campesina del estado Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. **Rev Fac Farm**, v. 44, p. 2-6, 2002.
- BILLAL, D.S., FENG, J., LEPROHON, P., LEGARE, D., QUELLETTE, M. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. **BMC Genomics**, v. 12, p. 512, 2011.
- BLAIR, J.M.A., WEBBER, M.A., BAYLAY, A.J., OGBOLU, D.O., PIDDOCK, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42, 2015.
- BONAR, E., WÓJCIK, I., WLADYKA, B. Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 367-381, 2015.
- BRACKMAN, G., CELEN, S., HILLAERT, U., VAN CALENBERGH, S., COS, P., MAES, L., NELIS, H.J., COENYE, T. Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio* spp. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16084, 2011.
- BREATHNACH, A.S., CUBBON, M.D., KARUNAHARAM, R.N., POPE, C.F., PLANCHE, T.D. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital waste-water systems. **Journal of Hospital Infection**, v. 82, n. 1, p. 19-24, 2012.

BRITO, J.S., FERREIRA, G.R.S., KLIMCZAK, E., GRYSHUK, L., SANTOS, N.D.L., PATRIOTA, L.L.S., MOREIRA, L.R., SOARES, A.K.A., BARBOZA, B.R., PAIVA, P.M.G., NAVARRO, D.M.A.F., DE LORENA, V.M.B., DE MELO, C.M.L., CORIOLANO, M.C., NAPOLEÃO, T.H. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 865-872, 2017.

BURMOLLE, M., THOMSEN, T.R., FAZLI, M.; DIGE, I., CHRISTENSEN, L., HOMOE, P., TVEDE, M., NYVAD, B., TOLKER-NIELSEN, T., GIVSKOV, M., MOSER, C., KIRKETERP-MOLLER, K., JOHANSEN, H.K., HOIBY, N., JENSEN, P.O., SORENSEN, S.J., BJARNSHOLT, T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 324-336, 2010.

CARMEN, J.C.; ROEDER, B.L.; NELSON, J.L.; OGILVIE, R.L.R.; ROBINSON, R.A.; SCHAALJE, G.B.; PITT, W.G. Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 2, p. 78-82, 2005.

CARNEIRO, R.F.; DE LIMA JR, P.H.P.; CHAVES, R.P.; PEREIRA, R.; PEREIRA, A.L.; DE VASCONCELOS, M.A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 213-222, 2017b.

CARNEIRO, R.F.; TORRES, R.C.F.; CHAVES, R.P.; DE VASCONCELOS, M.A.; DE SOUSA, B.L.; GOVEIA, A.C.R.; ARRUDA, F.V.; MATOS, M.N.C.; MATTHEWS-CASCON, H.; FREIRE, V.N.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylolepta* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017a.

CHANDRASEKARAN, G.; PARK, H.; WU, Y.; SHIN, H.J. Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the Korean cauliflower medicinal mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 4, p. 291-299, 2016.

CHEN, L.H.; XIONG, Z.H.; SUN, L.L.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. D641-D645, 2012.

CHEN, L.H.; ZHENG, D.D.; LIU, B.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2016 update: hierarchical and refined dataset for big data analysis- 10 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. D694-D697, 2016.

CHIKALOVETS, I.V.; CHERNIKOV, O.V.; PIVKIN, M.V.; MOLCHANOVA, V.I.; LITOVCHENKO, A.P.; LI, W.; LUKYANOV, P.A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 42, p. 503-507, 2015.

CHOTIRMALL, S.H.; MIRKOVIC, B.; LAVELLE, G.M.; McELVANEY, N.G. Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. **Mycopathologia**, v.178, n. 5-6, p. 363-370, 2014.

CORIOLOANO, M.C.; DE MELO, C.M.L.; SILVA, F.O.; SCHIRATO, G.V.; PORTO, C.S.; DOS SANTOS, P.J.P.; CORREIRA, M.T.S.; PORTO, A.L.F.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; COELHO, L.C.B.B. *Parkia pendula* Seed Lectin: Potential Use to Treat Cutaneous Wounds in Healthy and Immunocompromised Mice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2682-2693, 2014.

CORTES, M.E.; CONSUEGRA, J.; SINISTERRA, R.D. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Sci Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological advances**, v. 2, p. 896-905, 2011.

DA SILVA, P.M.; MOURA, M.C.; GOMES, F.S.; TRENTIN, D.S.; DE OLIVEIRA, A.P.S.; DE MELLO, G.S.V.; PITTA, M.G.R.; REGO, M.J.B.M.; COELHO, L.C.B.B.; MACEDO, A.J.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.

DE KRAKER, M.E.; WOLKEWITZ, M.; DAVEY, P.G.; GRUNDMANN, H.; BURDEN STUDY GROUP. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 55, p. 1598-1605, 2011.

DE LA FUENTE-NUÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R.E.W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

DEORUKHKAR, S.C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, ID. 456878, 2014.

DIAS, R.O.; MACHADO, L.S.; MIGLIOLO, L.; FRANCO, O.L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, jan. 2015.

DONG, Y.; CHEN, S.; WANG, Z.; PENG, N.; YU, J. Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 816-826, 2013.

DONLAN, R.M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 66-72, 2009.

FELDMAN, E.M.; KONTOYIANNIS, D.P.; SHARABI, S.E.; LEE, E.; KAUFMAN, Y.; HELLER, L. Breast implant infections: is cefazolin enough?. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 126, n. 3, p. 779-785, 2010.

FINKEL, J.S.; MITCHELL, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, p. 109-118, 2011.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Review Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.

FOLKESSON, A.; JELSBÄK, L.; YANG, L.; JOHANSEN, H.K.; CIOFU, O.; HOIBY, N.; MOLIN, S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 841, 2012.

FOSTER, T.J.; GEOGHEGAN, J.A.; GANESH, V.K.; HOOK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

GAO, W.; CHUA, K.; DAVIES, J.K.; NEWTON, H.J.; SEEMANN, T.; HARRISON, P.F.; HOLMES, N.E.; RHEE, H.W.; HONG, J.I.; HARTLAND, E.L.; STINEAR, T.P.; HOWDEN, B.P. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **PLOS Pathogens**, v. 6, p. e1000944, 2010.

GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, p. 159-173, 2013.

GOULD, I.M.; DAVID, M.Z.; ESPOSITO, S.; GARAU, J.; LINA, G.; MAZZEI, T.; PETERS, G. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 96-104, 2012.

GROSSER, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GODET, C.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; CAZENAVE-ROBLLOT, F. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, p. 20-23, 2016.

GUGALA, N.; LEMIRE, J.A.; TURNER, R.J. The efficacy of different anti-microbial metals at preventing the formation of, and eradicating bacterial biofilms of pathogenic indicator strains. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, p. 775-780, 2017.

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2015.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.; KATHJU, S.; HOIBY, N.; MOSER, C.; COSTERTON, W.; MOTER, A.; BJARNSHOLT, T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, p. 127-145, 2012.

HANLON, G.W.; DENYER, S.P.; OLLIFF, C.J.; IBRAHIM, L.J. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2746-2753, 2001.

HANNAN, T.J.; TOTSIKA, M.; MANSFIELD, K.J.; MOORE, K.H.; SCHEMBRI, M.A.; HULTGREN, S.J. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. **FEMS Microbiology Review**, v. 36, p. 616-648, 2012.

HE, J.; ANDERSON, M.H.; SHI, W.; ECKERT, R. Design and activity of a dual –targeted antimicrobial peptide. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 6, p. 532-537, 2009.

HE, Z.; WANG, Q.; HU, Y.; LIANG, J.; JIANG, Y.; MA, R.; TANG, Z.; HUANG, Z. Use of the quorum sensing inhibitor furanone c-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its *luxS* mutant strain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 30-35, 2012.

HEALEY, K. R.; ZHAO, Y.; PEREZ, W.B.; LOCKHART, S.R.; SOBEL, J.D.; FARMAKIOTIS, D.; KONTOYIANNIS, D.P.; SANGLARD, D.; TAJ-ALDEEN, S.J.; ALEXANDER, B.D.; JIMENEZ-ORTIGOSA, C.; SHOR, E.; PERLIN, D.S. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. **Nature Communications**, v. 7, p. 11128, 2016.

HERRMANN, G.; YANG, L.; WU, H.; SONG, Z.; WANG, H.; HOIBY, N.; ULRICH, M.; MOLIN, S.; RIETHMULLER, J.; DORING, G. Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 10, p. 1585-1592, 2010.

HOLMES, A.H.; MOORE, L.S.P.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P.J.; PIDDOCK, L.J.V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **THE LANCET**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G.L.; COENYE, T.; DONELLI, G.; HALL-STOODLEY, L.; HOLÁ, V.; IMBERT, C.; KIRKETERP-MOLLER, K.; LEBEAUX, D.; OLIVER, A.; ULLMAN, A.J.; WILLIAMS, C. ESCMID Guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Biology and Infection**, v. 21, n. 1, p. s1-s25, 2015.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.J.; MOSER, C.; JENSEN, P.O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 55-65, 2011.

HOOPER, S.; PERCIVAL, S.L.; WILLIAMS, D. Biofilms and implication in medical devices in humans and animals. **Biofilms in Veterinary Medicine**, Springer Press, Biofilm Series, 2011.

HOWLIN, R.P.; BRAYFORD, M.J.; WEBB, J.S.; COOPER, J.J.; AIKEN, S.S.; STOODLEY, P. Antibiotic-loaded synthetic calcium sulfate beads for prevention of bacterial

colonization and biofilm formation in periprosthetic infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 111-120, 2015.

HURLOW, J.; COUCH, K.; LAFORET, K.; BOLTON, L.; METCALF, D.; BOWLER, P. Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care. **Adv Wound Care**, v. 4, n. 5, p. 295-301, 2015.

JADHAV, S.; SHAH, R.; BHAVE, M.; PALOMBO, E.A. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 125-130, 2013.

JIMENEZ, P.N.; KOCH, G.; THOMPSON, J.A.; XAVIER, K.B.; COOL, R.H.; QUAX, W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 76, n. 1, p. 46-65, 2012.

JORGE, P.; LOURENÇO, A.; PEREIRA, M.O. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofouling**, v. 28, n. 10, p. 1033-1061, 2012.

KAO, C.Y.; SHEU, B.S.; WU, J.J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 1, p. 14-23, 2016.

KARNCHANATAT, A. Antimicrobial activity of lectins from plants, in: Bobbarala, V.(Ed.). **Antimicrobial Agents**, Rijeka, InTech, p. 145-178. 2012.

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

LAUPLAND, K.B.; LYYTIKAINEN, O.; SOGAARD, M.; KENNEDY, K.J.; KNUDSEN, J.D.; OSTERGAARD, C.; GALBRAITH, J.C.; VALIQUETTE, L.; JACOBSSON, G.; COLLIGNON, P.; SCHONHEYDER, H.C.; INTERNATIONAL BACTEREMIA SURVEILLANCE COLLABORATIVE. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* blood-stream infection: a multinational population-based surveillance study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 465-471, 2013.

LAVIGNE, J.P.; SOTTO, A.; NICOLAS-CHANOINE, M.H.; BOUZIGES, N.; PAGÈS, M.; DAVIN-REGLI, A. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 130-136, 2013.

LI, L.N.; GUO, L.H.; LUX, R.; ECKERT, R.; YARBROUGH, D.; HE, J.; ANDERSON, M.; SHI, W.Y. Targeted antimicrobial therapy against *Streptococcus mutans* establishes protective non-cariogenic oral biofilms and reduces subsequent infection. **International Journal of Oral Science**, v. 2, n. 2, p. 66-73, 2010.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux –mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555-1623, 2009.

LI, Z.; KOSOROK, M.R.; FARELL, P.M.; LAXOVA, A.; WEST, S.E.; GREEN, C.G.; COLLINS, J.; ROCK, M.J.; SPLAINGARD, M.L. Longitudinal development of mucoid

Pseudomonas aeruginosa infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. **JAMA**, v. 283, p. 581-588, 2005.

LOU, Z.; CHEN, J.; YU, F.; WANG, H.; KOU, X.; MA, C.; ZHU, S. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LTW – Food Science and Technology**, v. 80, p. 371-377, 2017.

MACCALUM, D.M. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, ID. 363764, 2012.

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

MAH, T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v.7. n. 9, p. 1061-1072, 2012.

MARKS, L.R.; PARAMESWARAN, G.I.; HAKANSSON, A.P. Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 80, p. 2744-2760, 2012.

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

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A.C.; COLEMAN, D.C.; AKPAKA, P.; BORG, M.; CHOW, H.; IP, M.; JATZWALK, L.; JONAS, D.; KADLEC, K.; KEARNS, A.; LAURENT, F.; O'BRIEN, F.G.; PEARSON, J.; RUPPELT, A.; SCHWARZ, S.; SCICLUNA, E.; SLICKERS, P.; TAN, H.L.; WEBER, S.; EHRLICH, R. A field guide to pandemic, epidemic, and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v.6, p. e17936, 2011.

MOURA, M.C.; NAPOLEÃO, T.H.; CORIOLANO, M.C.; PAIVA, P.M.G.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; COELHO, L.C.B.B. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.

MOURA, M.C.; TRENTIN, D.S.; NAPOLEÃO, T.H.; PRIMON-BARROS, M.; XAVIER, A.S.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, P.M.G.; MACEDO, A.J.; COELHO, L.C.B.B. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp. : antibacterial, antibiofilm, and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861-874, 2017.

MURUGAN, K.; SEKAR, K.; SANGEETHA, S.; RANJITHA, S.; SOHAIBANI, S.A. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory activity of *Achyranthes aspera* on cariogenic *Streptococcus mutans*: An in vitro and in silico study. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 728-736, 2013.

NADER, T.T.; COPPEDE, J.S.; AMARAL, L.A.; PEREIRA, A.M.S. Atividade antibiofilme de diterpeno isolado de *Croton antisiphiliticus* frente a *Staphylococcus aureus*. **Ars Veterinaria**, v.30, n. 1, p. 32-37, 2014.

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.L.; WACHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with the epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12, p. 963-976, 2011.

NEGREIROS, M.O.; PAWLOWSKI, A.; ZINI, C.A.; SOARES, G.L.G.; MOTTA, A.S.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Baccharis psiadioides* essential oil against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* strains. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3272-3279, 2016.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 34, n. 5, p. 877-886, 2015.

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

PAIVA, P.M.G.; PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. **Nova Science Publishers, Inc.**, New York, 2013.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013.

PERCIVAL, S.L.; HILL, K.E.; WILLIAMS, D.W.; HOOPER, S.J.; THOMAS, D.W.; COSTERTON, J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, p. 647-657, 2012.

PERLIN, D.S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drugs Resistance Updates**, v. 10, p. 121-130, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997-2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366-1377, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PIROFSKI, L.A.; CASADEVALL, A. Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. **BMC Biology**, v. 10, n. 6, 2012.

PROCÓPIO, T.F.; PATRIOTA, L.L.S.; MOURA, M.C.; DA SILVA, P.M.; OLIVEIRA, A.P.S.; CARVALHO, L.V.N.; LIMA, T.A.; SOARES, T.; DA SILVA, T.D.; COELHO,

L.C.B.B.; PITTA, M.G.R.; REGO, M.J.B.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

RAJ, C.A.; RAGAVENDRAN, P.; SOPHIA, D.; STARLIN, T.; RATHI, M.A.; GOPALAKRISHNAN, V.K. Evaluation of in vitro enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of leaf extract from *Alpinia purpurata* (Vieill) K.Schum. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 22, n. 9, p. 691-695, 2016.

RANDALL, C.P.; MARINER, K.R.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A.J. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 57, p. 637-639, 2013.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 117-128, 2010.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovate treatment strategies. **Journal of International Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. just-accepted, p. 00-00, 2017.

RYDZ, N.; SWYSTUN, L.L.; NOTLEY, C.; PATERSON, A.D.; RICHES, J.J.; SPONAGLE, K.; BOONYAWAT, B.; MONTGOMERY, R.R.; JAMES, P.D.; LILICRAP, D. The c-type lectin receptor clem4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. **Blood**, v. 121, p. 5228-5237, 2013.

SABU, M. Zingiberaceae and Costaceae of South India, Indian Association for Angiosperm Taxonomy, Calicut University, India, p. 68-70, 2006.

SADOYMA, G.; DIOGO FILHO, A., GONTIJO FILHO, P.P. Central venous catheter-related bloodstream infection caused by *Staphylococcus aureus*: microbiology and risk factors. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 10, p. 100-106, 2006.

SAHA, R.K.; ACHARYA, S.; JAMIRUDDIN, M.; ROY, P.; ISLAM, M.D.S.; SHOVON, S.S.H. Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 3, p. 44-51, 2014.

SANTOS, G.N.K.; DUTRA, K.A.; BARROS, R.A.; CÂMARA, C.A.G.; LIRA, D.D.; GUSMÃO, N.B.; NAVARRO, M.A.F. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 254-260, 2012.

SELIM, S.A.; ADAM, M.E.; HASSAN, S.M.; ALBALAWI, A.R. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 179, 2014.

SETH, A.K.; GERINGER, M.R.; NGUYEN, K.T.; AGNEW, S.P.; DUMANIAN, Z.; GALIANO, R.D.; LEUNG, K. P.; MUSTOE, T. A.; HONG, S.J. Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* biofilm-infected wounds: A new approach to chronic wound care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 131, n. 2, p. 225-234, 2013.

SKIEST, D.J.; VAZQUEZ, J.A.; ANSTEAD, G.M.; GRAYBILL, J.R.; REYNES, J.; WARD, D.; HARE, R.; BOPARAI, N.; ISAACS, R. Posaconazole for the treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 4, p. 607-614, 2007.

SMIT, J.; KORUP, E.; SCHONHEYDER, H.C. Infections associated with permanent pacemakers and implanted cardioverter-defibrillator devices. A 10-year regional study in Denmark. **Scandinavian Journal of Infectious diseases**, v. 42, n. 9, p. 658-664, 2010.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p. ID. 204237, 2013.

STEFANI, S.; CHUNG, D.R.; LINDSAY, J.A.; FRIEDRICH, A.W.; KEARNS, A.M.; WESTH, H.; MACKENZIE, F.M. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 273-282, 2012.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 877-886, 2013.

TAFF, H.T.; MITCHELL, K.F.; EDWARD, J.A.; ANDES, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.

TAFF, H.T.; NETT, J.E.; ZARNOWSKI, R.; ROSS, K.M.; SANCHEZ, H.; CAIN, M.T.; HAMAKER, J.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002848, 2012.

THUNY, F.; DI SALVO, G.; BELLARD, O.; AVIERINOS, J.F.; PERGOLA, V.; ROSENBERG, V.; CASALTA, J.P.; GOUVERNET, J.; DERUMEAUX, G.; IARUSSI, D.; AMBROSI, P.; CALABRO, R.; RIBERI, A.; COLLART, F.; METRAS, D.; LEPIDI, H.; RAOULT, D.; HARLE, J.R.; WEILLER, P.J.; COHEN, A.; HABIB, G. Risk of embolism and death in infective endocarditis. Prognostic value of echocardiography: a prospective multicenter study. **Circulation**, v. 112, n. 1, p. 69-75, 2005.

TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. **Acta Phatologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica**, v. 122, n. 138, p. 1-51, 2014.

TONG, S.Y.C.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, J.R.V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TURNER, K.H.; EVERETT, J.; TRIVEDI, U.; RUMBAUGH, K.P.; WHITELEY, M. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 10, p. e1004743, 2014.

UROZ, S.; DESSAUX, Y.; OGER, P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. **ChemBioChem**, v. 10, n. 2, p. 205-216. 2009.

USHA, H.L., KAIWAR, A., MEHTA, D. Biofilms in endodontic infections: new understanding to an old problem. **International Journal of Contemporary Dentistry**, v. 1, p. 44-51, 2010.

VAN'T WOUT, E.F.A.; VAN SCHADEWIJK, A.; VAN BOXTEL, R.; DALTON, L.E.; CLARKE, H.J.; TOMMASSEN, J.; MARCINIAK, S.J.; HIEMSTRA, P.S. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* induce both the unfolded protein and integrated stress responses in airway epithelial cells. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004946, 2015.

VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; SILVA, H.C.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.; TEIXEIRA, E.H.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M.O. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

VICTÓRIO, C.P.; KUSTER, R.M.; DE MOURA, R.S.; LAGE, C.L.S. Vasodilator activity of extracts of field *Alpinia purpurata* (Vieill) K.Schum. and *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 507-514, 2009.

VICTÓRIO, C.P.; LEITÃO, S.G.; LAGE, C.L.S. Chemical composition of the leaf oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith and *Alpinia purpurata* (Vieill) K.Schum. From Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 1, p. 52-54, 2010.

VILLAFLORES, O.B.; MACABEO, A.P.G.; GEHLE, D.; KROHN, K.; FRANZBLAU, S.G.; AGUINALDO, A.M. Phytoconstituents from *Alpinia purpurata* and their *in vitro* inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Pharmacognosy Magazine**, v.6, n. 24, p. 339-344, 2010.

VOULGARI, E.; POULOU, A.; KOUMAKI, V.; TSAKRIS, A. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back?. **Future Microbiology**, v. 8, p. 27-39, 2013.

WALKER, D.; FOWLER, T. Infections and the rise of antimicrobial resistance (Department of Health, 2011). **Annual report of the chief medical officer: volume two**, 2011.

WOZNIAK, R.A.; WALDOR, M.K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 552-563, 2010.

WU, H.J.; WANG, A.H.J.; JENNINGS, M.P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 93-101, 2008.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, n. 1-2, p. 12-22, 2013.

ZHANG, W.; BOUWMAN, K.M.; BEURDEN, S.J.V.; ORDONEZ, S.R.; EIJK, M.V.; HAAGSMAN, H.P.; VERHEIJE, M.H.; VELDHUIZEN, E.J.A. Chicken mannose binding lectin has antiviral activity towards infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 509, p. 252-259, 2017.

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M.B.; DEGENER, J.E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMUR, R.; HARMSSEN, H.J. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS ONE**, v. 5, p. 9321, 2010.

ZVEREVA, L.V.; VYSOTSKAYA, M.A. Filamentous fungi associated with bivalve mollusks from polluted biotopes of Ussuriiskii Bay, Sea of Japan. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 31, p. 382-385, 2005.