



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

JOSÉ DAYVID FERREIRA DA SILVA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MOLÉCULAS EXTRAÍDAS DE *Portulaca elatior*

Recife

2020

JOSÉ DAYVID FERREIRA DA SILVA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MOLÉCULAS EXTRAÍDAS DE *Portulaca elatior*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadores: Prof. Dr. Roberto Araújo Sá e Prof. Dra. Ten Feizi

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, José Dayvid Ferreira da
Atividades biológicas de moléculas extraídas de *Portulaca elatior* / José Dayvid Ferreira da Silva. – 2020.

146 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Araújo Sá.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ten Feizi.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Plantas da Caatinga. 2. Lectinas. 3. Agentes anti-infecciosos. I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora) II. Sá, Roberto de Araújo (coorientador) III. Feizi, Ten (coorientadora). IV. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-182

JOSÉ DAYVID FERREIRA DA SILVA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MOLÉCULAS EXTRAÍDAS DE *Portulaca elatior*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 23/04/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Pollyanna Michelle da Silva (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Francis Soares Gomes (Membro Externo)
Universidade Federal de Alagoas

Dra. Thâmarah de Albuquerque Lima (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico

Aos meus pais, **José Carlos e Silvania**, as minhas irmãs Dayziany (*in memorian*) e Dayvisiany, aos amigos e todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar ate aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo. Por toda a coragem, luz, determinação e força na escolha da direção correta a tomar e por dar-me a oportunidade de conhecer e conviver com tantas pessoas especiais. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante a minha vida.

À minha mãe, Silvania Ferreira dos Santos Silva, e ao meu pai, José Carlos da Silva Junior, por todo o amor, carinho e empenho na minha educação. Seus exemplos de luta e determinação, em buscar sempre o melhor para os filhos, são um **exemplo** para mim.

Às minhas irmãs Dayziany, que infelizmente não está mais presente neste plano, mas que com certeza olha por nós lá de cima, e Dayvisiany Silva por todo amor, carinho e incentivo.

À professora Dra. Patrícia Paiva, por ter me recebido de braços abertos e por ter sido muito mais do que uma orientadora durante o período do mestrado e doutorado. Obrigado pela confiança, apoio, incentivo, paciência e puxadas de orelha, eles foram fundamentais para a minha formação.

Ao professor Dr. Roberto de Araújo Sá, por ter feito parte dessa caminhada e por me dar todo apoio e suporte para que esse trabalho fosse concluído da melhor forma.

Ao professor Thiago Henrique Napoleão que sempre esteve presente me ajudando nos momentos mais difíceis. Seus ensinamentos e colaboração foram de suma importância para a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Emiliano Medei e a todos os integrantes do Laboratório de Cardioimunologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, em especial a Ainhoa, Mica, Bruno, Thabata, Oscar e Eduarda por todos os ensinamentos em Fisiologia Cardiovascular e pelo grande vínculo de amizade formado.

À Professora Ten Feizi e todo o grupo (em especial a Lisete Silva e Yan Liu) do *Glycosciences Laboratory* na *Imperial College London* por terem me recebido de braços abertos e pelo riquíssimo aprendizado obtido durante meu período em Londres.

A todos que fazem ou fizeram parte do laboratório BIOPROT e de alguma forma contribuíram imensamente para que este trabalho fosse realizado num ambiente amigável e profissional.

À Suellén pela amizade e por todo esforço para auxiliar na minha vida acadêmica e por ter aceitado trabalhar comigo desde sua iniciação científica, toda minha amizade e carinho.

A Wênio pela amizade e por ter escolhido trabalhar comigo e por todo esforço para auxiliar na conclusão desta Tese, toda minha amizade e carinho.

A Livia, Pollyana, Carlos, Robson, Poliana, Bruna, Danilo, Matheus, Stella e Yasmin pela colaboração, amizade e convivência no Bioprot.

A Pollyana Michelle e Maiara Celine pela amizade, colaboração e por todos os ensinamentos em Microbiologia.

A Professora Hanne Ingmer, da Universidade de Copenhagen, pela valiosa colaboração.

A Jainaldo por ter me ensinado que “A distância aproxima as pessoas” e por toda amizade construída.

Aos Cancelados (Jainaldo, Nathalia, Leyde e Amanda), por terem tornado esse finzinho de doutorado leve e feliz. Todo o meu afeto.

A Daniel Lins, todo o meu amor. Obrigado por trazer tantas coisas boas a minha vida. Você é incrível e eu só tenho a agradecer. Te amo!

À Ariele Mendes, amiga e irmã que a vida me presenteou.

Aos meus colegas e amigos da UPE que sempre estiveram presentes em minha vida (Mayra, Lorena, Vinicius, Tassia, Surama).

À eterna turma do Anexo V (Andréa, Estevão, Mayara, Luan, Rayana) por todas as aulas relax que a gente tinha e ainda vai ter nos bares da vida.

A Lilian e Well, que se tornaram mais que amigos durante esta caminhada.

A Rodrigo e à futura mamãe Dell pela colaboração e pela amizade. Amo vocês.

Às rangueiras (Caio, Eloyse, Iasmim, Carol, Rayana, Leslie, Ádila, Chaves, Vanessa Dias e Renata) por me mostrarem que a vida pode ser muito mais feliz quando se tem amigos.

Aos órgãos de fomento, CAPES e FACEPE, que foram imprescindíveis para que a tese fosse desenvolvida e que as parcerias na UFRJ e na Imperial College London se tornassem reais.

E por fim, mas não menos importante, a todos aqueles que não foram citados aqui, mas que fizeram parte da minha vida durante todo o meu doutorado, vocês têm todo o meu carinho.

“Um diamante é um pedaço de carvão que se saiu bem sob pressão.”

Autor Desconhecido

RESUMO

Plantas contêm lectinas e metabólitos secundários capazes de induzir respostas biológicas em células de plantas e animais. *Portulaca elatior* é uma planta da Caatinga que ainda não teve sua composição química e potencial biotecnológico amplamente estudados. Na presente tese, extratos orgânicos de caule e folhas foram avaliados quanto à composição química e suas propriedades antioxidantes, analisadas *in vitro* pelos ensaios de DPPH, ABTS e fosfomolibdênio, e citotóxicas frente a contra células humanas saudáveis e células leucêmicas. Adicionalmente, uma lectina do extrato da raiz de *P. elatior* foi isolada por cromatografia de afinidade, em coluna de quitina, e seu potencial antimicrobiano foi avaliado frente a microrganismos susceptíveis e resistentes a diversos antibióticos, além de analisar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades antimicrobianas e a citotoxicidade da lectina. A presença de metabólitos secundários foi determinada por cromatografias líquidas de camada fina e de alta performance. Flavonoides e derivados cinâmicos foram constituintes majoritários dos extratos orgânicos apresentando uma atividade antioxidante significativa. Os extratos orgânicos testados apresentaram efeitos antiproliferativos frente a células de K562, MOLT-4 e HL-60, tendo seu IC₅₀ variando de 5,13 a 9,66 µg/mL; não foram citotóxicos nem hemolíticos frente a células humanas saudáveis. A lectina da raiz de *P. elatior* (PeRoL) apresentou um ponto isoelétrico de 3.8, uma massa molecular nativa de 33 kDa, dividida em duas subunidades de 15kDa cada, ligadas por pontes de sulfeto. A atividade hemaglutinante de PeRoL não foi afetada por elevadas temperaturas e se apresentou estável na faixa de pH ácida. O dissacarídeo trealose foi identificado como o inibidor endógeno de PeRoL, presente nas raízes da planta. PeRoL apresentou atividade bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (concentração mínima inibitória de 8.1, 32.5 e 4.06 µg/mL, respectivamente); apresentou atividade bactericida contra três cepas de *S. aureus* (susceptível, resistente a oxacilina e resistente a metilicina) (concentração mínima bactericida de 20, 40 e 40 µg/mL, respectivamente). Adicionalmente, foi detectado efeito sinérgico da lectina com cefuroxima e cefoxitina, contra as cepas resistentes de *S. aureus*, sem alterar a expressão dos fatores de virulência investigados. PeRoL não foi capaz de inibir a ação hemolítica de *S. aureus*, entretanto foi um agente anti-agregador para a cepa suscetível deste microrganismo.

A atividade bactericida da proteína também foi detectada contra *Klebsiella pneumoniae* resistente a polimixina (16 µg/mL), porém não causou alterações morfométricas nas células. PeRoL induziu a morte de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida krusei* com uma concentração mínima fungicida de 16 µg/mL; Para *C. albicans* e *C. krusei* a lectina inibiu a formação de biofilme, além de se ligar a glicanos presentes na parede celular fúngica. A lectina foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados ainda nas primeiras horas de incubação, além de não ser citotóxica e nem hemolítica para células humanas saudáveis. Em conclusão, folhas e caule de *P. elatior* contêm extratos orgânicos com uma ótima atividade antioxidante e antitumoral. As raízes de *P. elatior* contêm uma lectina ligante de trealose, termoestável e potente antimicrobiana.

Palavras-chave: PeRoL. Atividade antimicrobiana. Sinergismo. Bactérias super-resistentes. Atividade antitumoral. Efeito antioxidante.

ABSTRACT

Plants contain lectins and secondary metabolites capable of inducing biological responses in plant and animal cells. *Portulaca elatior* is a Caatinga plant that has not yet been widely studied for its chemical composition and biotechnological potential. In the present thesis, organic extracts of stem and leaves were evaluated for chemical composition and antioxidant properties, analyzed in vitro by DPPH, ABTS and phosphomolibdenum tests, and cytotoxic against healthy human cells and leukemic cells. Additionally, a lectin from root's extract of *P. elatior* was isolated by affinity chromatography on a chitin column, and its antimicrobial potential was evaluated against susceptible and resistant microorganisms, in addition the action mechanisms involved in the antimicrobial activities and lectin cytotoxicity were evaluated. The presence of secondary metabolites was determined by thin layer and high-performance liquid chromatographies. Flavonoids and cinnamic derivatives were major constituents of organic extracts with significant antioxidant activity. The tested organic extracts showed antiproliferative effects against K562, MOLT-4 and HL-60 cells, with their IC₅₀ ranging from 5.13 to 9.66 µg/mL; they were neither cytotoxic nor hemolytic when compared to healthy human cells. The *P. elatior* root lectin (PeRoL) showed an isoelectric point of 3.8, a native molecular mass of 33 kDa, divided into two subunits of 15kDa each, linked by sulfide bridges. The hemagglutinating activity of PeRoL was not affected by high temperatures and was stable in the acidic pH range. The trehalose disaccharide was identified as the endogenous PeRoL inhibitor, present in the plant's roots. PeRoL showed bacteriostatic activity against *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (minimum inhibitory concentration of 8.1, 32.5 and 4.06 µg/mL, respectively); showed bactericidal activity against three strains of *S. aureus* (susceptible, resistant to oxacillin and resistant to methicillin) (minimum bactericidal concentration of 20, 40 and 40 µg / mL, respectively). Additionally, a synergistic effect of lectin with cefuroxime and cefoxitin was detected against the resistant strains of *S. aureus*, without altering the expression of the investigated virulence factors. PeRoL was not able to inhibit the hemolytic action of *S. aureus*, however it was an anti-aggregating agent for the susceptible strain of this microorganism. The bactericidal activity of the protein was also detected against polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* (16 µg/mL), but did not cause morphometric changes in cells. PeRoL induced the death of *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida*

albicans and *Candida krusei* with a minimum fungicidal concentration of 16 µg/mL; For *C. albicans* and *C. krusei*, the lectin inhibited biofilm formation, in addition to binding to glycans present in the fungal cell wall. Lectin was able to inhibit the growth of all tested microorganisms in the first hours of incubation, in addition to being neither cytotoxic nor hemolytic for healthy human cells. In conclusion, *P. elatior* leaves and stem contain organic extracts with excellent antioxidant and anti-tumor activity. The roots of *P. elatior* contain a thermostable and potent antimicrobial trehalose-binding lectin.

Keywords: PeRoL. Antimicrobial activity. Synergism. Super-resistant bacteria. Antitumor activity. Antioxidant effect.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	CAATINGA	17
2.2	PLANTAS TÓXICAS.....	18
2.3	FAMÍLIA PORTULACACEAE	20
2.4	MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	22
2.5	LECTINAS	29
2.6	TECNOLOGIA NEOGLICOLIPÍDICA	37
2.7	METABÓLITOS SECÚNDARIOS DE PLANTAS.....	40
3	RESULTADOS.....	47
3.1	INVESTIGAÇÃO ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E FITOQUÍMICA DE FOLHAS E CAULE DE <i>PORTULACA ELATIOR</i>	47
3.2	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS, SINÉRGICAS E ANTI-VIRULÊNCIA DA LECTINA DA RAIZ DE <i>PORTULACA ELATIOR</i> CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	68
3.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE RAIZ DE <i>PORTULACA ELATIOR</i> (PeRoL) CONTRA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> RESISTENTE À COLISTINA.....	91
3.4	<i>PORTULACA ELATIOR</i> ROOT LECTIN (PeRoL): RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS FÚNGICOS E EFEITOS NO CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> E <i>CANDIDA KRUSEI</i>	105
4	CONCLUSÃO.....	124
	REFERÊNCIAS.....	125
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES.....	139

1 INTRODUÇÃO

A rica biodiversidade brasileira inclui inúmeras plantas com potencial farmacológico e que vêm sendo utilizadas pela população no controle de diversas doenças (MENEGUELLI *et al.*, 2017). O semiárido brasileiro possui uma parte significativa desta diversidade, principalmente na região conhecida como Caatinga (SANTOS *et al.*, 2017).

Lectinas são proteínas que ligam carboidratos ou glicoconjugados, de forma específica e reversível (LIMA *et al.*, 2018). São moléculas com diversas propriedades biológicas e vastamente encontradas em plantas. Sharon e Lis (2004) afirmam que as lectinas desempenham papéis importantes no controle da biossíntese de glicoconjugados, imunidade inata, regulação do crescimento e apoptose das células e regulação do ciclo celular. Do ponto de vista biotecnológico, têm sido relatadas atividades antitumoral, anti-inflamatória, inseticida e antimicrobiana (PAIVA *et al.*, 2011; PROCÓPIO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

A atividade antibacteriana das lectinas resulta da interação com ácidos teicoicos e teicurônicos, peptideoglicanos e lipopolissacarídeos presentes na parede celular bacteriana. As lectinas podem causar a formação de poros na parede celular promovendo a morte bacteriana pelo extravasamento do conteúdo celular (PAIVA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2015). A atividade antifúngica de lectinas resulta da interação com a parede celular de hifas, o que pode levar à redução na absorção de nutrientes, assim como interferir no processo de germinação de esporos (LAM & NG, 2011; JONES, 2017).

Os metabólitos secundários, tais como compostos fenólicos, terpenoides, óleos essenciais, alcaloides, entre outros, são compostos elaborados a partir de metabólitos primários (AL-ANI, 2015). Estes compostos estão presentes nas plantas

superiores e apresentam grande diversidade, podendo ser separados em nitrogenados (alcaloides, aminoácidos não proteicos, aminas, alcalmidas, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e não nitrogenados (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, saponinas, flavonoides, esteroides, cumarinas). A diversidade é ainda maior, uma vez que esses compostos principais originam diversos derivados, de acordo com o tecido ou órgão da planta e o estágio de desenvolvimento. Muitos destes produtos por suas atividades biológicas e farmacológicas são usados como agentes quimioterápicos ou servem como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos (SOLÁROVÁ, 2020).

O gênero *Portulaca* apresenta cerca de 120 espécies, 13 delas no Brasil (COELHO & GIULIETTI, 2010), sendo a região Nordeste a que mais apresenta espécies descritas. *Portulaca elatior* (MART. EX ROHRB, 1872) encontrada nos municípios de Juazeiro e Castro Alves, Estado da Bahia, no município de Petrolândia, Estado do Pernambuco, no município de Aroeiras, Estado da Paraíba e em outros locais do semiárido nordestino (COELHO *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos contemplam a purificação e caracterização estrutural de uma lectina (PeRoL: *P. elatior* root lectin) isolada da raiz de *P. elatior*. PeRoL foi avaliada quanto os efeitos da lectina sobre: crescimento e sobrevivência de bactérias e fungos de importância médica, bem como os mecanismos envolvidos na ação contra duas espécies de *Candida* e sua ação na formação de biofilme; citotoxicidade frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMC's), atividade hemolítica. A identificação das classes majoritárias de metabólitos secundários presentes em extratos orgânicos de folhas e caule de *P. elatior* foram avaliados quanto: atividade antioxidante, citotoxicidade frente a células humanas normais (PBMC's), células tumorais e atividade hemolítica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar moléculas bioativas de folhas, caule e raiz de *Portulaca elatior*, determinando seu potencial antimicrobiano, antioxidante, citotóxico e hemolítico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extratos salinos de folhas, caule e raiz de *P. elatior* e isolar lectina a partir do extrato salino com maior atividade hemaglutinante específica.
- Caracterizar a lectina isolada quanto ao ponto isoelétrico, massa molecular nativa, composição de subunidades, peptídeos obtidos após a digestão da lectina com tripsina, estabilidade da estrutura, atividade hemaglutinante frente a íons e diferentes valores de pH e temperatura e quanto aos glicanos ligantes por *Microarray*.
- Investigar a lectina isolada frente as atividades hemolítica e citotóxica sobre células humanas normais e tumorais.
- Investigar a lectina isolada quanto a sua atividade frente a microrganismos sensíveis e super-resistentes.
- Investigar a lectina isolada quanto a sua atividade contra espécies de *Candida*.
- Obter extratos orgânicos de folhas e caule de *P. elatior*.
- Identificar metabólitos secundários presentes em extratos orgânicos de folhas, caule e raiz de *P. elatior*.
- Investigar a atividade antioxidante dos extratos orgânicos.
- Investigar os extratos orgânicos obtidos quanto à atividade hemolítica, citotóxica frente células humanas normais e tumorais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAATINGA

O número de espécies de plantas conhecidas no Brasil é de aproximadamente 46 mil. Uma parte significativa desta diversidade está contida na Caatinga, maior região de Floresta Sazonalmente Seca Tropical, encontrada exclusivamente na região semiárida do Nordeste brasileiro (FERNANDES *et al.*, 2018).

A Caatinga ocupa uma área equivalente a 11% do território nacional, distribuída pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e Minas Gerais (Figura 1). É composta por uma grande variedade de plantas, a depender dos períodos de chuva, tipo de solo e altitude. Este tem sido considerado um ecossistema bastante degradado, o que tem comprometido a sua biodiversidade. (LEAL *et al.* 2005; ARAÚJO, *et al.*, 2008; ALVES *et al.* 2009; MMA, 2020).

Figura 1. Distribuição Geográfica da Caatinga



Fonte: ALVES *et al.* (2009)

Estima-se que pelo menos 932 espécies já foram registradas para a região, sendo 380 endêmicas (MMA, 2020). A Caatinga é um tipo de formação vegetal com características bem definidas: árvores baixas e arbustos que, em geral, perdem as folhas na estação seca (espécies caducifólias). Apresenta três estratos: arbóreo (8 a 12 metros), arbustivo (2 a 5 metros) e herbáceo (abaixo de 2 metros) (BAUER *et al.*, 2016). A precipitação anual média no bioma é de 590 milímetros e é fortemente concentrada numa estação chuvosa curta, seguida por uma estação seca marcante de até 10 meses (FARIAS *et al.*, 2017).

Várias espécies de plantas encontradas na Caatinga apresentam atividades biológicas diversas, dentre elas atividade anticolinesterásica (CASTRO, 2016; DE LIRA TEIXEIRA, 2019), gastroprotetora (ARAÚJO DE LIMA *et al.*, 2017), antioxidante (ARAÚJO *et al.*, 2015; DE LIRA TEIXEIRA, 2019) analgésica (ARAÚJO *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2020), antialérgica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011), antiinflamatória (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2020), anticoagulante (ARAÚJO *et al.*, 2011; LUZ *et al.*, 2019), ansiolítica (RIBEIRO *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2019), tripanocida (SOUZA *et al.*, 2017) e antimicrobiana (CARVALHO *et al.*, 2015; BIASI-GARBIN *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2020).

A identificação de compostos bioativos em plantas da Caatinga contribui para promover o desenvolvimento biotecnológico do semiárido e valorizar a região como fonte de recursos para o homem, o que estimula a sua conservação (ALVES, 2007; PEREIRA JUNIOR, 2014; LIMA *et al.*, 2020).

2.2 PLANTAS TÓXICAS

Entende-se por planta tóxica aquela capaz de causar uma determinada enfermidade ou até mesmo morte, em homens e/ou animais, quando consumida *in*

natura (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Numerosas espécies de plantas, no mundo todo, são consideradas tóxicas, principalmente na pecuária (LEONG *et al.*, 2017). No Brasil, o número de plantas conhecidas e relatadas como tóxicas para ruminantes e equinos têm tido um aumento gradual. Em 1990, Tokarnia *et al.* (1990) mencionam a existência de 60 espécies tóxicas. Em 2000, eram conhecidas 90 espécies pertencentes a 52 gêneros (RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001). Em 2004 este número aumentou para 113 espécies e 64 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2007); em 2008, 122 espécies e 71 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2009), em 2012, 129 espécies e 78 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2012) e em 2017, 131 espécies e 79 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2017).

São conhecidas pelo menos 38 plantas tóxicas na Região Nordeste, sendo as mais importantes *Mimosa tenuiflora*, para caprinos e ovinos, *Mascagnia rigida* e *Thiloa glaucocarpa* para bovinos (TOKARNIA *et al.*, 2000, RIET-CORREA *et al.*, 2017). O número de plantas tóxicas conhecidas aumenta consideravelmente com a exploração de novas áreas. Um exemplo disso é o Estado da Paraíba, onde até o ano 2000 eram conhecidas 8 plantas tóxicas e, após a criação de um grupo de pesquisa em plantas tóxicas esse número aumentou para 21 (RIET-CORREA *et al.*, 2017).

Dentre as diversas patologias causadas por plantas tóxicas, destacam-se os distúrbios gastrointestinais, pois podem causar morte súbita nos animais (PESSOA *et al.*, 2013). São conhecidas, no nordeste brasileiro, atualmente, 7 espécies de plantas tóxicas que afetam o sistema digestivo dos ruminantes: *Enterolobium contortisiliquum* (BACHA *et al.*, 2017), *Stryphnodendron coriaceum* (PUPIN *et al.*, 2017) e *Luetzelburgia auriculata*, que causam alterações digestivas com lesões degenerativas dos pré-estômagos e diarreia ou fezes amolecidas (CAVALCANTI *et*

al., 2017); *Arrabidaea corallina*, que causa diarreia (PESSOA *et al.*, 2013); *Plumbago scandens*, que causa degeneração e necrose da mucosa dos pré-estômagos com pigmentação da urina e mucosa do trato digestivo (MEDEIROS *et al.*, 2001); *Centratherum brachylepis*, que causa degeneração e necrose dos pré-estômagos com edema de face e garganta (OHFUJI *et al.*, 2016); *Dieffenbachia* sp., que causa edema na língua e face (DANTAS *et al.*, 2007) e *Portulaca elatior*, que ataca primariamente o sistema digestivo e depois o sistema nervoso dos ruminantes (OLIVEIRA NETO *et al.*, 2017).

2.3 FAMÍLIA PORTULACACEAE

Com distribuição cosmopolita, a família Portulacaceae possui cerca de 30 gêneros e 500 espécies. Os gêneros mais representativos são: *Portulaca* com cerca de 100 espécies, *Calandrinia* com cerca de 150 espécies e *Talinum* com mais de 50 espécies (CAROLIN, 1993; NYFFELER & EGGLI 2010). Coelho (2015) relatou, no Brasil, 15 espécies em dois gêneros: *Talinum* e *Portulaca*, sendo o *Portulaca* com 13 espécies.

O gênero *Portulaca* apresenta plantas herbáceas, raramente arbustivas ou arbóreas, geralmente suculentas, de folhas simples, alternas, sub-opostas, verticiladas, inflorescências cimosas ou apresentando flores solitárias. Suas flores são bissexuadas, raramente unissexuadas, actinomorfas e monoclamídeas (geralmente com um par de bractéolas) (COELHO *et al.*, 2010).

A espécie *Portulaca elatior* (Figura 2) é caracterizada por apresentar hábito ereto, pouco comum no gênero *Portulaca*, com caules variando de 20 a 80 cm de altura. O caule é bastante ramificado desde a base, apresentando cor verde ou avermelhado, neste último caso quando encontrado em ambientes áridos da

Caatinga. As folhas se apresentam lineares e pouco suculentas (COELHO *et al.*, 2010).

Figura 2. *Portulaca elatior*



Fonte: O autor.

Diversas espécies do gênero *Portulaca* são descritas na região do semiárido brasileiro. *P. elatior* já foi relatada no Estado da Bahia, municípios de Castro Alves e Juazeiro, em Pernambuco no município de Petrolândia e na Paraíba no município de Aroeiras e de Gado Bravo (GALIZA *et al.*, 2011; MACHADO-FILHO *et al.*, 2012, RIET-CORREA *et al.*, 2017). Como já mencionado, essa espécie foi descrita por

produtores rurais, como causa de manifestações clínicas de perturbações gastrointestinais em ruminantes. Os sinais clínicos observados foram intensa salivação, relutância em se movimentar, tremores de lábios, marcha levemente incoordenada arrastando as pinças dos membros posteriores, diarreia, timpanismo, dor abdominal, gemidos, desidratação e berros constantes. A morte ocorria 2 a 48 horas após o início dos sinais clínicos. (ALBUQUERQUE *et al.* 2007; SILVA *et al.* 2009; COELHO *et al.*, 2010; GALIZA *et al.*, 2011; RIET-CORREA *et al.*, 2017).

2.4 MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS

Os microrganismos patogênicos causam diversas doenças infecciosas que podem levar até à morte do indivíduo, seja por septicemia ou outra complicação. Apesar dos primeiros triunfos sobre doenças infecciosas com o desenvolvimento de vacinas e antibióticos, bem como o advento da penicilina, patógenos novos e multirresistentes estão emergindo continuamente causando infecções mais severas e poucos antibióticos novos têm sido inseridos na clínica (WALSH, 2020).

O surgimento de agentes microbianos patogênicos resistentes a múltiplos fármacos representa um desafio de saúde pública no mundo (World Health Organization, 2019). A capacidade de adaptação genética frente às mudanças ambientais é a principal responsável pela resistência bacteriana aos antimicrobianos, em resposta, principalmente, ao amplo uso desses medicamentos (STEFANIUK *et al.*, 2016). Atualmente, cerca de 700 mil mortes, por ano, no mundo são causadas por microrganismos multirresistentes (World Health Organization, 2019).

Diversos fatores podem contribuir para o aumento da resistência aos antimicrobianos e vão desde terapias inadequadas de pacientes infectados, a

atrasos na iniciação da antibioticoterapia apropriada. Fatores estes que associados ao uso indiscriminado de fármacos favorecem o surgimento de cepas resistentes (BARROS *et al.*, 2012). A resistência microbiana pode ser classificada em natural, quando um fármaco não tem ação sobre um determinado microrganismo devido as características próprias a ele; e adquirida, que se desenvolve quando uma cepa se torna resistente a um fármaco ao qual era sensível anteriormente, ocorrendo por mecanismos genéticos diversos como: alteração do receptor para ação da droga, produção de enzimas inativadoras, via metabólica alternativa. (MOREHEAD, 2018).

Atualmente, é imprescindível compreender os processos relacionados à resistência microbiana, buscar novos agentes antimicrobianos efetivos contra cepas multirresistentes, bem como identificar os mecanismos de ação destes novos agentes (OLIVEIRA *et al.*, 2016; WALSH, 2020).

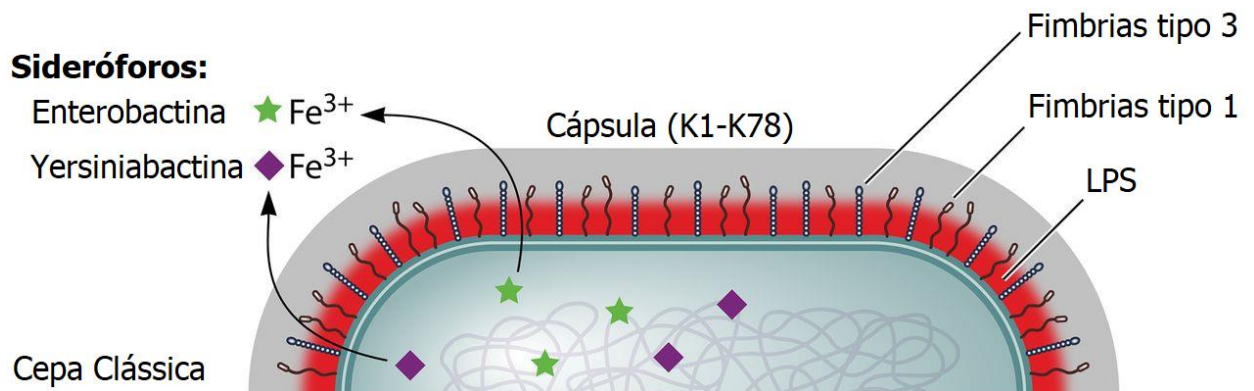
2.4.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella é um gênero que compreende bacilos Gram-negativos, imóveis, anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose e produtores de cápsula mucoide, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Esse gênero é composto por algumas espécies, como: *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* e *Klebsiella pneumoniae* (LI *et al.*, 2014) sendo, a última, um patógeno oportunista humano, causador mais comum de infecções nosocomiais e comunitárias (PODSCHUN E ULLMANN, 1998), como pneumonia, infecções no trato urinário, na corrente sanguínea, infecções de feridas cirúrgicas, peritonite, septicemia, meningite (NAMRATHA *et al.*, 2015) e abscesso hepático piogênico (LEDERMAN E CRUM, 2005).

Klebsiella pneumoniae possui diversos fatores de virulência (Figura 3) envolvendo cápsula, lipopolissacarídeos (LPS), fimbrias, adesinas não-fimbriais e

sistemas de eliminação de ferro (sideróforos) (PACZOSA E MECSAS, 2016). Além disso, a patogenicidade de *Klebsiella* é aumentada pela sua capacidade de formação de biofilme (DESAI *et al.*, 2019).

Figura 3. Fatores de virulência caracterizados em *Klebsiella pneumoniae*.



Adaptado de PACZOSA E MECSAS (2016)

A capacidade da cepa clássica de *K. pneumoniae* (cKp) desenvolver resistência a múltiplas drogas, do inglês *Multidrug resistant* (MDR), e formar biofilme torna o tratamento de infecções extremamente difícil (SADEKUZZAMAN *et al.*, 2015). Um número cada vez maior de surtos hospitalares em unidades de terapia intensiva (UTIs) e maternidades vem sendo causadas por cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* (MOELLERING *et al.*, 2010; POMAKOVA *et al.*, 2012).

Os principais mecanismos de resistência antimicrobiana são a diminuição na absorção dos antibióticos (PAGÈS *et al.*, 2008), modificação dos alvos dos antibióticos (SANDER *et al.*, 2002) e inativação do antibiótico (PATERSON *et al.*, 2005). Contudo, novos mecanismos vêm sendo descobertos, incluindo efluxo de múltiplas drogas, integrons, hipermutabilidade e a transferência de plasmídeos, este último tem facilitado a disseminação de resistência entre as cepas (LIVERMORE, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a *K. pneumoniae* como uma forte ameaça à saúde pública, uma vez que esse microrganismo é capaz de produzir enzimas que degradam uma variedade de antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). As principais enzimas produzidas são as betalactamases de espectro estendido (ESBL), carbapenemase (KPC), metalobetalactamases (MBL) e betalactamases classe C (AmpC). Cepas produtoras dessas enzimas têm se disseminado mundialmente e são responsáveis por elevar os custos dos tratamentos, além de aumentar as taxas de morbimortalidade (HAWKEY and JONES, 2009; MEYER and PICOLI, 2011). Cepas produtoras de Carbapenemase (KPC) apresentam resistência a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis incluindo os antibióticos carbapenêmicos (PACZOSA E MECSAS, 2016).

As cepas produtoras de ESBLs apresentam resistência às cefalosporinas e aos monobactâmicos, já as cepas produtoras de KPC apresentam resistência a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis incluindo os antibióticos carbapenêmicos (PACZOSA E MECSAS, 2016).

O aumento global no número de casos envolvendo cKp com resistência múltipla a cefalosporinas, monobactâmicos, beta-lactâmicos e carbapenêmicos fez com que a colistina (polimixina E) fosse reintroduzida no tratamento de infecções por este microrganismo. No entanto, casos de cepas resistentes a colistina também já foram reportados (OLAITAN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; MACESIC, 2019). A colistina tem sido a última opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC. Com isto, as opções de tratamento para cepas resistentes estão cada vez menores, fica destacada a

necessidade do uso de novas abordagens antimicrobianas (OLAITAN *et al.*, 2014b; NATION *et al.*, 2015).

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, sendo frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais. Tem a forma de cocos e tende a ser organizada isodamente, aos pares, em cadeias curtas ou agregados, comumente, descritos como "cachos de uvas". São imóveis, não esporulantes e geralmente não encapsuladas (LOWY, 1988; RASIGADE *et al.*, 2014).

S. aureus é o agente causador de várias infecções humanas, incluindo bacteremia, endocardite infecciosa, infecções de pele e tecidos moles (impetigo, foliculite, furúnculos, carbúnculos, celulite, síndrome da pele escaldada e outros), osteomielite, artrite séptica, infecções por dispositivos protéticos, infecções pulmonares (pneumonia e empiema), gastroenterite, meningite, síndrome de choque tóxico e infecções do trato urinário (TONG *et al.*, 2015).

O potencial patogênico de *S. aureus* está relacionado com diversos mecanismos para evitar a resposta imune do hospedeiro e inclui a produção de cápsulas antifagocítica, seqüestro de anticorpos do hospedeiro ou mascaramento de antígenos pela proteína A, formação de biofilme, sobrevivência intracelular e quimiotaxia de bloqueio de leucócitos (FOSTER, 2005; DELEO *et al.*, 2009). Também apresenta diversos fatores de virulência que facilitam a fixação, interação célula-célula, colonização e danos teciduais (TANG *et al.*, 2017; KONG *et al.*, 2018).

As cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à diversas classes de antibiótico (MRSA) carregam um gene *mecA* no cromossomo bacteriano, que está localizado em um complexo genético móvel chamado cassete cromossômico *mec* estafilocócico ou *Staphylococcal Cassete Chromosomal mec* (SCCmec), conferindo

resistência a vários antibióticos, dependendo do tipo de SCCmec (YAHAV *et al.*, 2019). O gene *mec* codifica a proteína PBP2a (proteína 2a de ligação à penicilina). PBP-2a é uma proteína de ligação à penicilina (PBP), ou enzima essencial da parede celular bacteriana que catalisa a produção do peptidoglicano na parede celular bacteriana. O PBP-2A tem uma afinidade mais baixa para se ligar a beta-lactâmicos (e outros antibióticos derivados da penicilina) quando comparado a outros PBPs; portanto, o PBP-2A continua a catalisar a síntese da parede celular bacteriana mesmo na presença de muitos antibióticos. Como resultado, as cepas de *S. aureus* que sintetizam PBP2a tendem a ser resistentes à metilicina, nafcilina, oxacilina e cefalosporinas (BAIG *et al.*, 2019; DELORME *et al.*, 2019).

O tratamento de pacientes com infecção causada por MRSA tem se tornado um desafio de saúde pública, uma vez que essas cepas são resistentes aos beta-lactâmicos. Como alternativa aos beta-lactâmicos, o uso de glicopeptídeos, como a vancomicina, tem se tornado cada vez mais comum como alternativa para o tratamento de infecções por essas linhagens multirresistentes (GARDNER *et al.*, 2018). Entretanto, o uso frequente dessa classe de antibióticos também tem diminuído a sensibilidade de cepas MRSA a esta droga, em escala global (WILCOX *et al.*, 2019). O antibiótico linezolida, único antibiótico da classe do oxazolidinona, vem sendo amplamente utilizado para cepas MRSA resistentes a vancomicina (PERUGINI *et al.*, 2015). Porém, cepas MRSA resistentes a linezolida têm sido descritas (WEI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019).

2.4.3 *Candida*

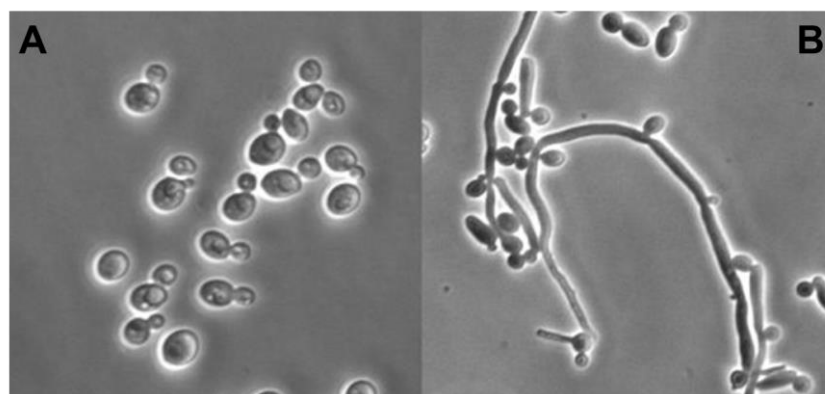
O gênero *Candida*, pertencente à família Saccharomycetaceae, é constituído por 163 espécies. São fungos polimorfos e algumas espécies são responsáveis por causar infecções no homem através de micoses superficiais e/ou invasivas. (SILVA,

2002). Espécies de *Candida* são cosmopolitas e fazem parte da microbiota normal dos humanos, colonizando as mucosas do trato gastrointestinal, boca, vagina e pele. As espécies de maior importância médica são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*. (TONG *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas tornaram-se cada cada vez mais comuns em ambientes hospitalares acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos (LIMPER *et al.*, 2017). A incidência de infecções por *Candida* variam de 2 a 6,7 por 1.000 admissões hospitalares, sendo 5 a 10 vezes maiores em UTI's que nas enfermarias em geral. (DAS, 2019).

O gênero *Candida* é responsável por infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos. Possui patogenicidade e fatores de virulência que auxiliam na invasão e adesão ao epitélio e mucosa, como o dimorfismo. O dimorfismo compreende o crescimento leveduriforme (blastocónídeos) e forma filamentosa (Figura 4), interfere na patogenicidade uma vez que as hifas possuem maior capacidade de aderência e penetração em célula animal do que os blastocónídeos. São ainda termotolerantes e produtoras de hidrolases e de biofilme (HILLER, 2011). As hidrolases são essenciais na adesão, penetração tecidual e invasão, facilitando o dano dos tecidos do hospedeiro pelas fosfolipases, proteases e hemolisinas produzidas (EL-HOUSSAINI *et al.*, 2019).

Figura 4. Dimorfismo apresentando morfologia leveduriforme (a) e filamentosa (b).



Fonte: HILLER (2011)

2.4.4 Biofilme

O biofilme microbiano é uma comunidade estruturada de células fechadas em uma matriz polimérica autoproduzida e aderente a uma superfície inerte ou viva, que constitui um modo de crescimento protegido permitindo a sobrevivência em ambiente hostil. Os microrganismos formadores de biofilme utilizam mecanismos específicos para fixação inicial a uma superfície (adesão), seguido de formação de microcolônia levando ao desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme maduro. Eles diferem de suas contrapartes de vida livre (planctônicas) em sua taxa de crescimento, composição e aumento da resistência a antibióticos, anticorpos em virtude da regulação positiva e / ou negativa de seus genes (LIN *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2019).

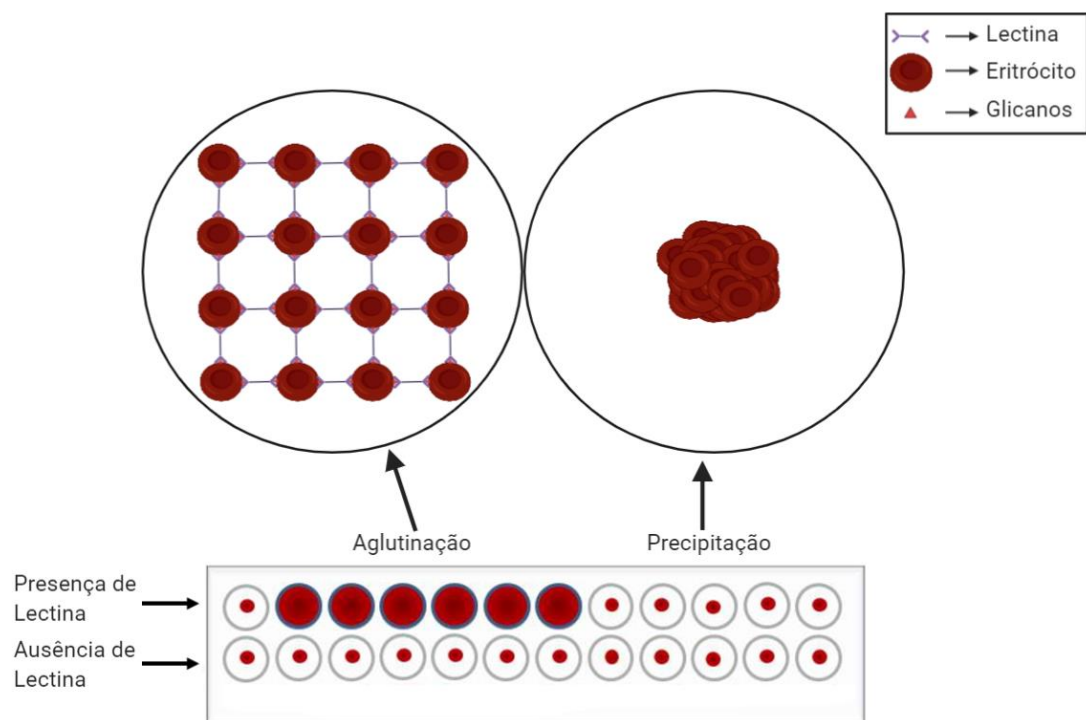
2.5 LECTINAS

Lectinas são proteínas com a capacidade de reconhecer e se associar a carboidratos por interações de Van der Waals ou pontes de hidrogênio, de forma reversível e com elevada afinidade, sem, contudo, apresentarem características imunológicas ou promovem alteração na estrutura covalente do carboidrato (LIS & SHARON, 1998; CAMACHO, 2007; SILVA *et al.*, 2010; KARNCHANATAT, 2012; FREIRE *et al.*, 2015). Estas proteínas são detectadas pela sua capacidade de se ligar aos carboidratos da superfície de células (PAIVA *et al.*, 1992; LAM *et al.*, 2011; GEMEDE *et al.*, 2014).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser detectada a partir de ensaios de aglutinação, sendo mais comumente utilizado o de hemaglutinação (Figura 5). Nesse teste, é realizada uma diluição seriada da amostra contendo lectina e posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. Os eritrócitos utilizados podem ser de

humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído), aumentando ou não a sensibilidade das células à lectina (PAIVA *et al.*, 1992; LAM *et al.*, 2011). O ensaio de inibição por carboidratos se dá pela adição de um açúcar ou glicoproteína ao tampão NaCl 0,15M, assim é possível verificar a especificidade da lectina, além de confirmar a presença da lectina, uma vez que outros compostos como taninos e lipídeos podem interagir de modo não específico com os eritrócitos, resultando em um falso positivo (FREIRE *et al.*, 2015).

Figura 5. Esquema ilustrativo de ensaio de hemaglutinação.



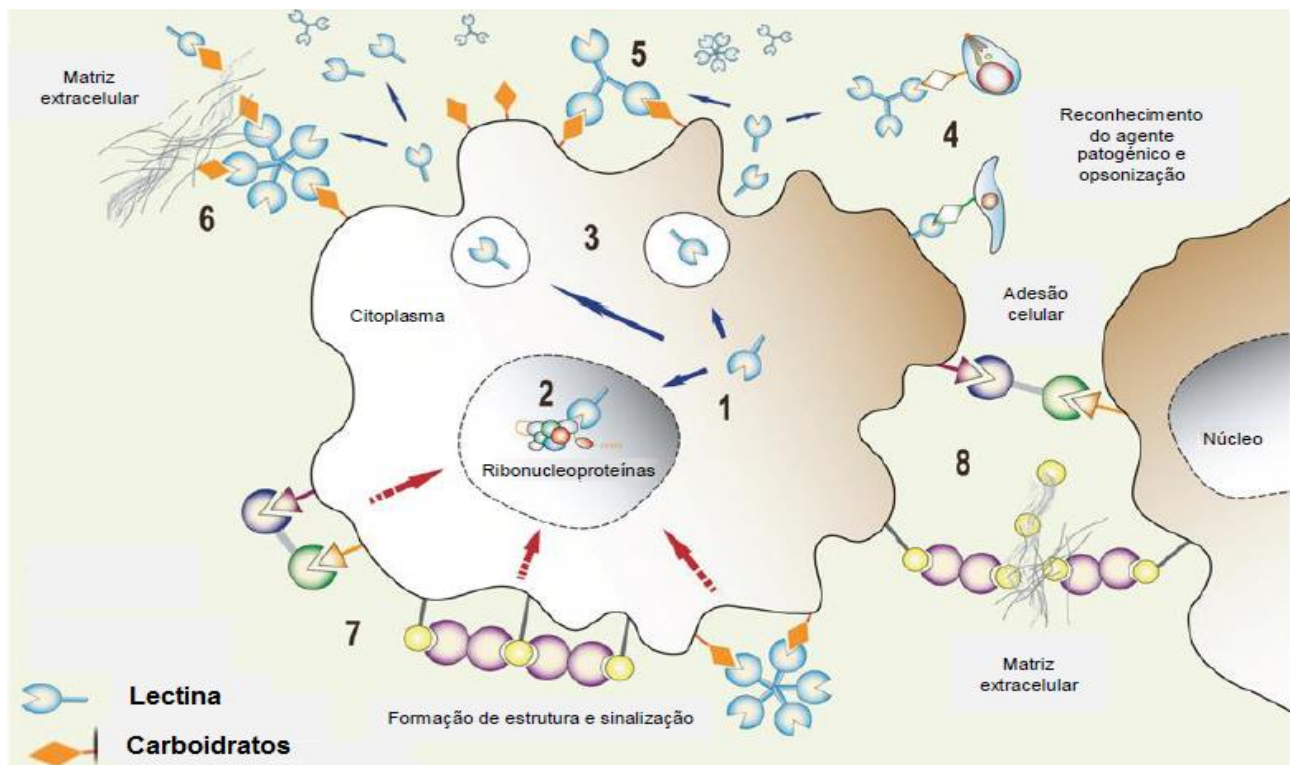
Fonte: O autor.

Atualmente, sabe-se que as lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais, bactérias, fungos e vírus (SARTIM *et al.*, 2017). No entanto, as primeiras lectinas foram extraídas de plantas, devido à facilidade de extração e ao rendimento elevado (SHARON & LIS, 1990).

Nos vegetais, as lectinas têm sido encontradas em cerne, folhas, flores, sementes, cascas, raízes e rizomas (YANG *et al.*, 2011; SANTANA *et al.*, 2012; (PROCÓPIO *et al.*, 2017).

As lectinas, devido à suas diferenças estruturais e de especificidade, apresentam uma grande variedade funcional. A Figura 6 representa algumas funções desempenhadas pelas lectinas.

Figura 6. Representação da diversidade funcional das lectinas.



Adaptado de VASTA *et al.* (2012)

As lectinas que se encontram no citoplasma (1) podem ser armazenadas nos vacúolos de reserva proteica, podem ser translocadas para o núcleo da célula (2) ou secretadas para o meio extracelular (3), onde funcionam como receptores de carboidratos de agentes patogênicos (4), estabelecem ligações entre si, formando complexos que se ligam a carboidratos presentes na célula que as sintetizou (5) e a carboidratos da matriz extracelular (6). Podem desencadear cascatas de sinalização

(apoptose, migração celular, liberação de mediadores) (7) ou promover interações célula-célula e célula-matriz (8) (VASTA *et al.*, 2012; GABIUS *et al.*, 2016).

2.5.1 Classificação

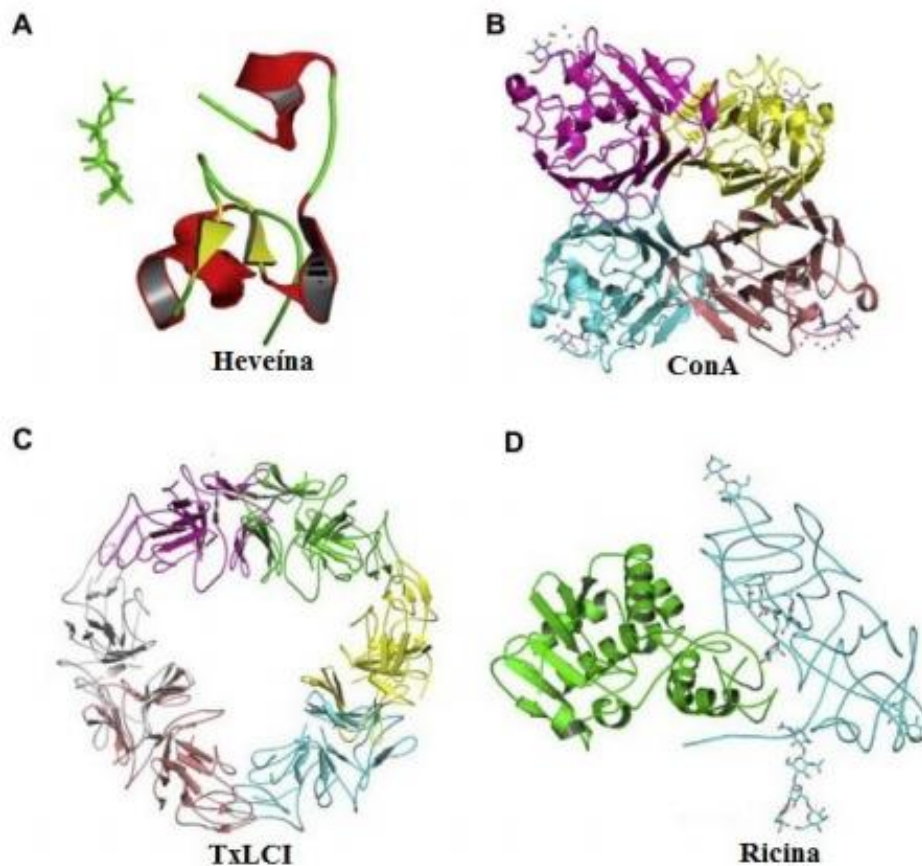
As lectinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura, especificidade de ligação ao carboidrato e domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD – *Carbohydrate Recognition Domain*) (GODULA *et al.*, 2018). Quanto à estrutura, as lectinas podem ser classificadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 7). As merolectinas são proteínas que contêm apenas um domínio de ligação a carboidratos. As hololectinas têm pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos idênticos. As quimerolectinas são constituídas por um ou mais domínios de ligação a carboidratos incorporando outros domínios que exercem outra atividade biológica, sendo as hololectinas e as quimerolectinas estruturas bastante abundantes nas lectinas de plantas. Por fim, as superlectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos estruturalmente diferentes (VANDENBORRE *et al.*, 2011; KARNCHANATAT, 2012; FREIRE *et al.*, 2015; ITAKURA *et al.*, 2017).

As lectinas também são classificadas de acordo com a especificidade de ligação ao carboidrato em seis grupos: ligadoras de glicose/manose, ligadoras de galactose/N-acetilgalactosamina, ligadoras de N-acetilglicosamina, ligadoras de L-fucose, ligadoras de ácido siálico e ligadoras de glicanos complexos (PEUMANS *et al.*, 1995; KARNCHANATAT, 2012; ITAKURA *et al.*, 2017).

A classificação *CRD* é atribuída em função da estrutura dos domínios que estabelecem e reconhecem a ligação ao carboidrato. Sendo assim, as lectinas de plantas são classificadas em quatro grupos: lectinas de monocotiledôneas que se

ligam a carboidratos α -D-manose, lectinas de domínio folhas- β , domínio homólogo à cianovirina-N e lectinas de leguminosas, sendo este ultimo grupo o mais estudado (VARROT *et al.*, 2011; JOHN *et al.*, 2013; ITAKURA *et al.*, 2017).

Figura 7. Representação ilustrativa da estrutura de lectinas quanto ao domínio de ligação a carboidrato. (A) Merolectinas; (B) Hololectinas; (C) Superlectinas; (D) Quimerolectinas.



Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2010)

2.5.2 Propriedades Biológicas e Aplicações

As lectinas de plantas desempenham diversas funções fisiológicas, uma delas é a proteção contra agentes patogênicos externos devido a sua capacidade de aglutinar e imobilizar esses agentes. Para desempenhar esta função as lectinas estão presentes nos locais com maior potencial de invasão e tem a capacidade de se ligar a vários patógenos, inibindo o seu crescimento nas plantas; outra função é a capacidade de interagir com células animais, o que pode ser visto no contexto

ecológico como proteção das plantas contra predadores e herbívoros. Quando ingeridas por insetos, por exemplo, ligam-se a receptores glicosilados ao longo do trato intestinal provocando desconforto, repelindo assim o predador (efeito antinutricional) (SHARON & LIS, 2004; VANDENBORRE *et al.*, 2011; KARNCHANATAT, 2012; BUUL & BROUNS, 2014; ITAKURA *et al.*, 2017).

Atualmente, as lectinas são alvo de grande interesse devido as suas aplicações na agricultura, na biotecnologia e investigação biomédica (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades biológicas e aplicações das lectinas em diferentes áreas

Atividade / aplicação	Eventos envolvidos
Inseticida	Modulação da atividade enzimática com consequente ruptura das microvilosidades, interações entre lectina e receptores glicosilados do trato digestivo dos insetos. ⁽²⁾
Antibacteriana	Interação com componentes da parede celular bacteriana. ⁽¹⁾
Antifúngica	Ligação às hifas, resultando na diminuição da absorção de nutrientes e interferência no processo de germinação dos esporos. ⁽³⁾⁽⁴⁾
Antiviral	Interferência na fase inicial do ciclo de replicação do vírus suprimindo o crescimento. ⁽³⁾
Antitumoral	Reconhecimento de células tumorais e indução de apoptose e necrose, estimulação mitogênica e ação imunomoduladora. ⁽³⁾
Biomarcador	Marcadores de superfície celular. ⁽⁵⁾
Purificação e caracterização de polissacarídeos e glicoconjugados	Emprego de lectinas imobilizadas em matrizes cromatográficas para estudos de proteoglicanos, glicoproteínas ou glicolípideos. ⁽³⁾

Referências: MOURA *et al.*, 2017 (1); LIMA, 2018 (2); BAH *et al.*, 2013 (3); SILVA *et al.*, 2018 (4); RÊGO *et al.*, 2013 (5);

2.5.3 Atividade Antimicrobiana de Lectinas

Recentes estudos têm mostrado o potencial das lectinas na Microbiologia. As lectinas possuem a habilidade de reconhecer especificamente carboidratos e com isso se tornam ferramentas valiosas para estudar a interação entre os carboidratos presentes nas células eucarióticas e patógenos. Muitos patógenos iniciam a adesão seguida da infecção usando carboidratos da superfície celular como receptores ou ligantes (CARVALHO *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2017). Como exemplos, foi demonstrado que *Escherichia coli* se liga a resíduos de manose nas células hospedeiras (RABBANI *et al.*, 2017), *Neisseria gonorrhoeae* se liga especificamente a N-acetil-lactosamina, *Streptococcus pneumonia* se liga a pentasacarídeos, tetra e trisacarídeos, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* se liga especificamente a fucose (MUBAIWA *et al.*, 2017).

As bactérias possuem em suas paredes celulares ácidos teicóicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos que podem interagir com lectinas. A habilidade de lectinas de ligar especificamente a carboidratos permite o emprego dessas proteínas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas, o que se baseia na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (IORDACHE *et al.*, 2015). Diferentes padrões de aglutinação de bactérias, promovidas por 23 lectinas, foram analisadas e mostraram que a interação lectina-bactéria é uma boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium* (MAYER *et al.*, 2018).

Lectinas também têm sido usadas com grande sucesso na identificação de fungos, devido a sua alta especificidade a carboidratos presentes na parede celular fúngica (ZABEL & MORRELL, 1992; MONTEIRO *et al.*, 2002). O conhecimento do perfil sacarídico na superfície fúngica habilita o uso de lectinas como promissoras

sondas celulares, que podem servir como carreadores de agentes antifúngicos que utilizam, como alvos específicos, os carboidratos existentes na superfície da célula do microrganismo (DUFRENE *et al.*, 2015).

As lectinas possuem ação antimicrobiana, o que pode levar à inibição do crescimento ou até mesmo à morte do microrganismo. Atividade antifúngica foi observada para uma lectina isolada da cianobactéria *Scytonema varium* que teve ação frente *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* (JONES *et al.*, 2017), lectina de *Solanum integrifolium* frente aos fungos *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioide* (CHEN *et al.*, 2018), bem como para a lectina encontrada na sarcotesta de *Punica granatum*, que teve ação frente a *Candida albicans* e *Candida krusei* (SILVA *et al.*, 2018). Del Rio *et al.* (2018) purificaram e caracterizaram uma lectina de sementes de *Helianthus annuus* que teve ação fungicida contra o fitopatogeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Boteli *et al.* (2007) mostraram que lectinas podem formar uma barreira na superfície da parede celular de *Candida sp.*, alterando sua estrutura e permeabilidade. Efeitos indiretos relacionados a ligação de quitina na parede celular também estão sendo estudados (LATGE *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2011).

Estudo com as lectinas extraídas de sementes de *Artocarpus heterophyllus*, *Canavalia ensiflora*, *Pisum sativum* e *Lens culinaris* apresentou um CMI de 1 mg/mL para as 4 lectinas testadas contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, porém apenas a lectina de *Artocarpus heterophyllus* foi bactericida (NAIR, *et al.*, 2013). Procópio *et al.* (2017) reportou atividade bacteriostática e antibiofilme da lectina de folhas de *Calliandra surinamensis* contra *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus*. A lectina de sementes de *Indigofera heterantha* apresentou efeito bactericida contra *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Bacillus*

subtilis (QADIR *et al.*, 2013). A lectina extraída de folhas de *Schinus terebinthifolius* (SteLL) apresentou atividade bactericida contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* e *Salmonella enteritidis* (GOMES *et al.*, 2013). A lectina extraída de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) apresentou atividade antibacteriana, antibiofilme e antiadesiva contra *Serratia marcescens* e *Bacillus sp* (MOURA *et al.*, 2017).

Moura *et al.* (2015) mostraram que WSMoL inibiu o crescimento bacteriano, em poucas horas, de *Bacillus pumillus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens*. WSMoL também provocou a perda da integridade da membrana celular de *S. marcescens*, além da liberação de proteínas intracelulares para o meio extracelular.

Silva *et al.* (2016) descreveram uma nova lectina extraída de *Punica granatum* com atividade antibacteriana envolvendo inibição do crescimento, aderência e invasão celular.

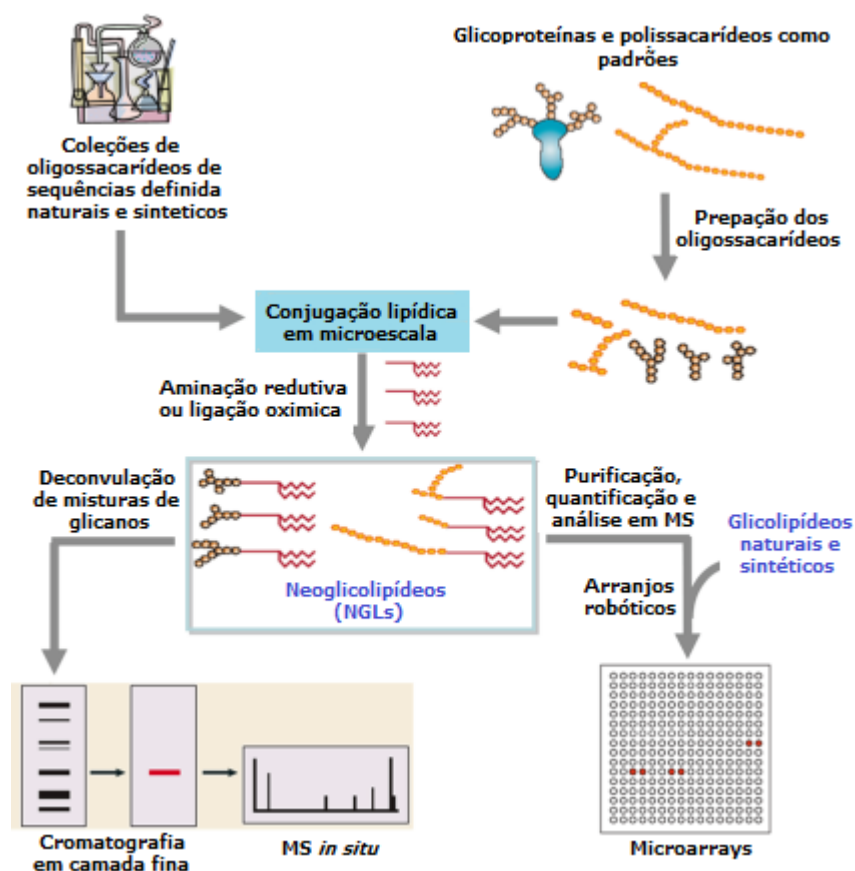
2.6 TECNOLOGIA NEOGLICOLIPÍDICA

A tecnologia neoglicolipídica (NGL) foi originalmente introduzida por Feizi e colaboradores em 1985 como uma nova abordagem para o estudo de antigenicidade e funções receptoras das cadeias de carboidratos das glicoproteínas (TANG *et al.*, 1985). Foi projetada para atender à necessidade de análise em microescala e apresentação de oligossacarídeos de forma multivalente para o estudo de interações carboidrato-proteína, que geralmente são fracas. A tecnologia envolve a conjugação de oligossacarídeos por aminação redutora a um 1,2-di-hexadecil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE) (PALMA *et al.*, 2014).

A tecnologia NGL foi adaptada para gerar o primeiro sistema de microarrays para sequências definidas de oligossacarídeos em 2002 e esta evoluindo estudos moleculares das interações proteína-carboidrato, tanto em sistemas de reconhecimento endógeno quanto em interações patógeno-hospedeiro (FUKUI *et al.*, 2002).

Com o uso de hardware e imagem de matriz robótica de alta precisão, a tecnologia, atualmente, é a base de um sistema avançado de microarranjo de carboidratos, que atualmente abrange mais de 900 resíduos de oligossacarídeos ligadas a lipídios, impressas em lâminas de vidro revestidas com nitrocelulose em concentrações na escala de fentomol (10^{-15}) (Fig. 8) (LI *et al.*, 2018).

Figura 8. Representação esquemática da plataforma de *microarrays* de oligossacarídeos à base de NGL.



Adaptado de Liu *et al.* (2010)

Uma característica especial do sistema de *microarrays* de oligossacarídeos à base de NGL é que os resíduos de oligossacarídeos ligados a lipídios são imobilizadas de maneira não covalente em matrizes sólidas e, portanto, têm potencial mobilidade; essa é uma vantagem em comparação com a maioria dos sistemas de *microarrays* de carboidratos nos quais os oligossacarídeos são imobilizados covalentemente (por reações químicas) e, portanto, "fixados" nas superfícies do arranjo; esta apresentação não covalente imita até certo ponto o arranjo de estruturas de oligossacarídeos agrupadas na superfície celular.

Os *microarrays* baseados em NGL estão fornecendo informações cruciais sobre as especificidades de uma variedade de sistemas de reconhecimento de carboidratos operando endogenamente e em interações patógeno-hospedeiro (LENMAN *et al.*, 2018; VENDELE *et al.*, 2020). Entre contribuições recentes estão (1) a atribuição de ligantes para um receptor chave do sistema imunológico inato contra patógenos fúngicos (VENDELE *et al.*, 2020); (2) a demonstração da sulfatação como modulador do reconhecimento de carboidratos pelos receptores de ligação ao ácido siálico do sistema imunológico, conhecidos como proteínas da superfície celular que se ligam ao ácido siálico (*siglecs*) (MCQUILLAN *et al.*, 2019); (3) a descoberta do análogo N-glicolil do gangliosídeo GM1 (que os seres humanos não sintetizam) como o receptor de célula hospedeira preferido para o vírus Simian 40 (SV40), o que pode explicar a alta suscetibilidade dos símios a esse patógeno (LENMAN *et al.*, 2018); (4) a descoberta do ligante para uma nova proteína no retículo endoplasmático, a malectina (SCHALLUS *et al.*, 2008; LOURENÇO, 2017); e (5) a elucidação de especificidades de ligação de carboidratos de várias proteínas adesivas de superfície importantes de *Toxoplasma gondii* e outros parasitas

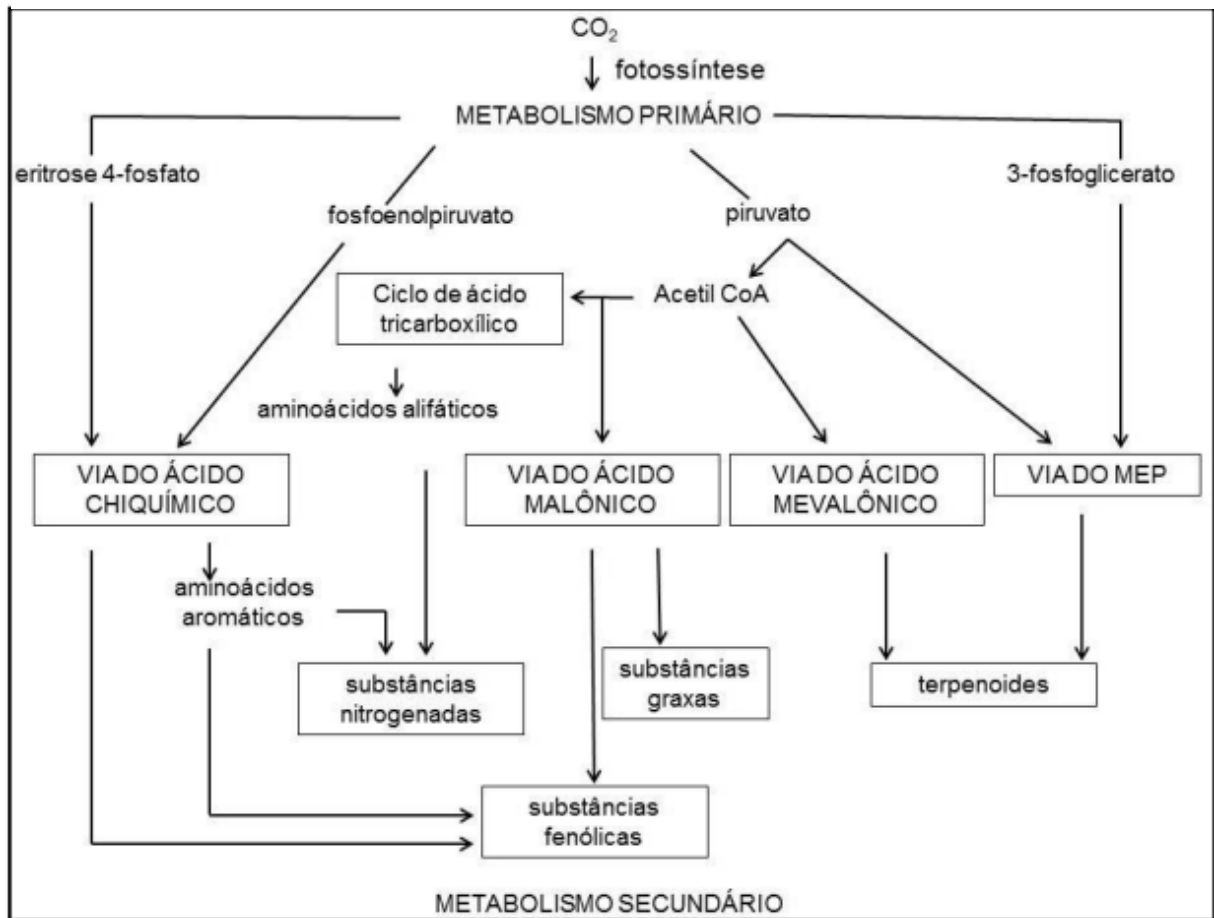
apicomplexan (MATIN *et al.*, 2017), fornecendo pistas sobre tropismos no hospedeiro / tecido e patobiologia das infecções por esses parasitas.

2.7 METABÓLITOS SECÚNDARIOS DE PLANTAS

O metabolismo representa um conjunto de reações químicas que ocorrem em células, sejam elas animais ou vegetais. Metabólitos são os compostos químicos formados, degradados ou transformados, que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2017). O metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos que desempenham funções essenciais nas plantas, tais como a respiração, fotossíntese e o transporte de solutos. Já o metabolismo secundário é produzido a partir de produtos do metabolismo primário e não está envolvido nos processos metabólicos básicos da planta (SANTIN, 2017).

Os metabólitos secundários são encontrados principalmente em plantas, fungos e outros microrganismos. Apesar da grande diversidade de metabolitos conhecidos, toda essa gama de substâncias produzida é sintetizada a partir de quatro vias metabólicas principais: via do acetato-malonato (ácido malônico), via do acetato-mevalonato (ácido mevalônico), via do metileritritol fosfato (MEP) e a via do ácido chiquímico (Figura 9), todas provenientes do metabolismo primário (DEWICK, 2009).

Figura 9. Esquema geral simplificado da interface entre o metabolismo primário e as vias de síntese dos metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Taiz & Zeiger (2017)

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (TAIZ & ZEIGER, 2017). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do MEP (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (PERES, 2004; BABY, 2015).

Metabólitos secundários estão sendo alvos de vários estudos por causa das diversas atividades biológicas que seus compostos apresentam. Apresentam atividades antimicrobiana, anticâncer, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (SIMÕES, 2010; COMPEAN, 2014). O grande número de atividades biológicas mostra a necessidade e a importância de um conhecimento mais amplo sobre esses compostos. Entender seus mecanismos de ação pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados atualmente como a resistência microbiana às drogas sintéticas ou os prejuízos causados pelo uso desordenado de pesticidas.

2.7.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico, pois são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas. Nas plantas vasculares, cerca de 40% dos compostos fenólicos provêm da via do Ácido Malônico e 60% são originados da via do ácido chiquímico, sendo esta última ausente em animais (TAIZ & ZEIGER, 2017). São caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático, no qual pelo menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila. A sua diversidade estrutural se deve à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes como mostradas na Tabela 2. Dentro deste grupo se destacam os flavonoides e os não flavonoides, sendo ambos encontrados em vegetais.

Tabela 2. Classes de compostos fenólicos em plantas.

ESTRUTURA	CLASSE
C ₆	Fenóis
C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzoicos
C ₆ -C ₃	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas e xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenzenos e antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides: flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavonas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados ou proantocianidinas

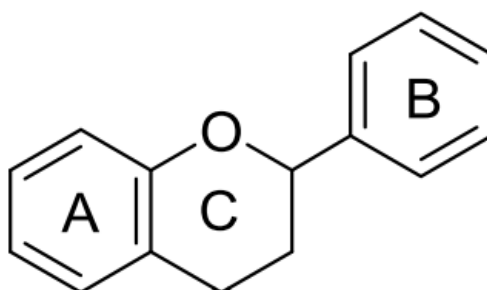
C₆ – anel benzênico

Fonte: Fonte: Adaptado de Taiz & Zeiger (2017)

2.7.1.1 Flavonoides

Flavonoides são estruturas fenólicas encontradas abundantemente em células fotossintetizantes. São normalmente encontradas em diversas partes da planta. Na natureza pode-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais. Quimicamente, os flavonoides são moléculas que contém uma estrutura formada por quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado central C, acoplado ao anel A (Figura 10).

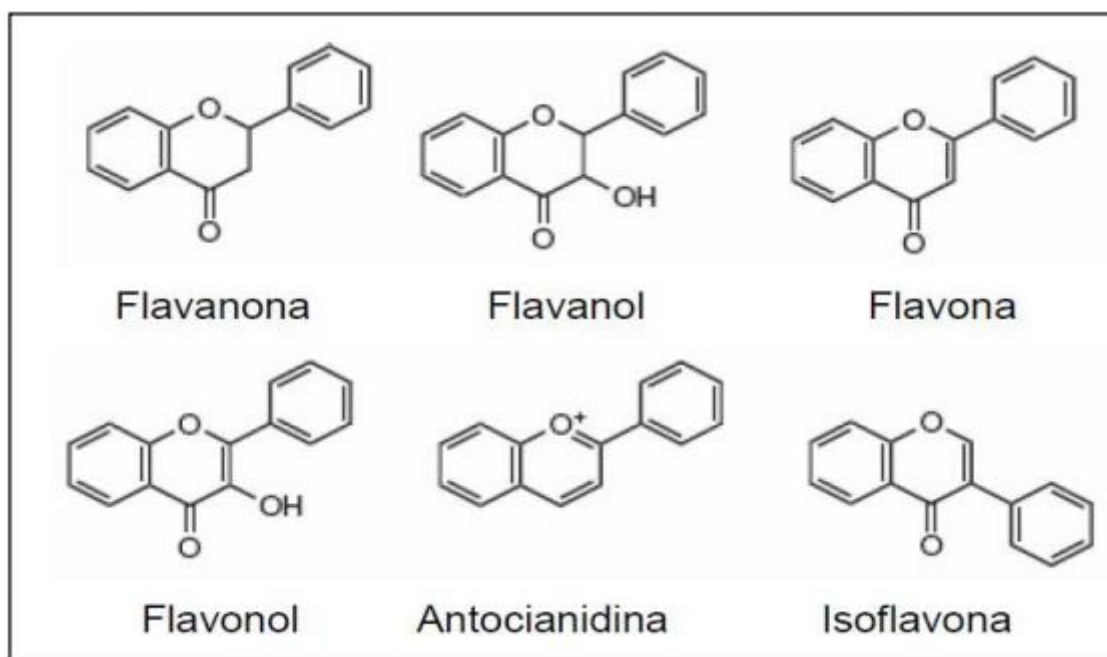
Figura 10. Estrutura fundamental dos flavonoides.



Fonte: O autor

Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (Figura 11) (ROCHA, 2011).

Figura 11. Estrutura das principais classes dos flavonoides.



Fonte: DUTRA (2009)

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. São importantes agentes de defesa contra microrganismos fitopatogênicos (produção de fitoalexinas) e insetos, atuando como defensores naturais das plantas na forma de resposta química à invasão de patógenos, além de proteger os vegetais contra incidências de raios ultravioletas e atrair animais com finalidade de polinização (SIMÕES *et al.*, 2010).

Possuem propriedades farmacológicas comprovadas no organismo humano, como capacidade antioxidativa, atividade anti-inflamatória, ação antialérgica, atividade antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, antiplaquetária,

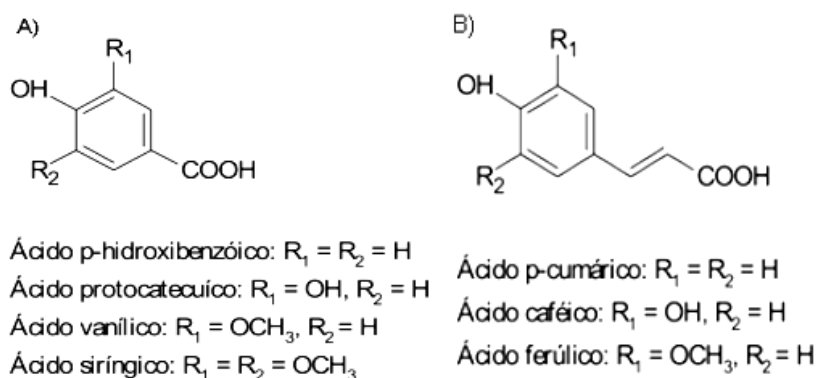
antimicrobiana e antiviral (AGRAWAL, 2011; BHATTACHARJEE, 2013; FLAMBÓ, 2013; XIE, 2015).

A capacidade antioxidante é a propriedade mais difundida dos flavonoides. É comprovada sua eficácia no combate ao envelhecimento precoce ao inibir a ação da enzima xantina oxidase, responsável pela oxidação dos tecidos (DÔRES, 2007). Eles são compostos doadores de elétrons e possuem estruturas químicas conjugadas ricas em grupos hidroxilas, com grande potencial de ação sobre agentes oxidantes (MACHADO *et al.*, 2008).

2.7.1.2 Compostos fenólicos não-flavonoides

A classe dos não flavonoides não apresenta uma estrutura básica em comum e, portanto, é uma classe muito heterogênea (CHEYNIER, 2005). Os não flavonoides são classificados como: derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico (ANGELO; JORGE, 2007). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C₆-C₁; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico, sendo os mais comuns (Figura 12).

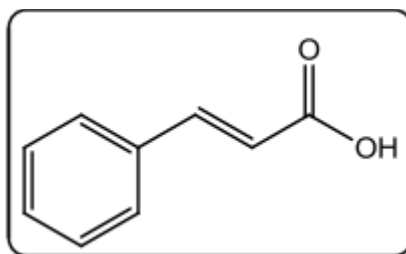
Figura 12. Estrutura química dos Ácidos hidroxibenzoicos (A) e Hidroxicinâmicos(B).



Fonte: DUTRA (2009)

O ácido cinâmico (Figura 13) consiste em um ácido aromático encontrado em diversas plantas superiores. Ele pertence à classe das auxinas, que são reconhecidos como hormônios vegetais de regulação do crescimento e diferenciação celular. A atividade citotóxica, contra células tumorais, do ácido cinâmico e de seus derivados é bastante conhecida. Estudos revelam que o ácido cinâmico é um importante agente antiproliferativo, inibindo a síntese de DNA de células tumorais em crescimento (DE *et al.*, 2011).

Figura 13. Estrutura química do Ácido cinâmico.



Fonte: DE *et al.* (2011)

Os derivados cinâmicos desempenham um papel importante como intermediários para a produção de diferentes fármacos (SHARMA, 2011). Atualmente, o ácido cinâmico e seus derivados têm despertado o interesse de diversos pesquisadores, devido às suas diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antifúngica, antibacteriana (CHIRIAC *et al.*, 2005), além do efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (LEE *et al.*, 2003; DE *et al.*, 2011; XIE, 2015).

3 RESULTADOS

Os resultados da presente tese serão apresentados em formato de artigo.

3.1 INVESTIGAÇÃO ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL E FITOQUÍMICA DE FOLHAS E CAULE DE *PORTULACA ELATIOR*

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Phytomedicine”



Fator de Impacto: 4.180

Investigação antioxidante, antitumoral e fitoquímica de folhas e caule de *Portulaca elatior*

José Dayvid Ferreira da Silva^a, Suéllen Pedrosa da Silva^a, Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho^b, Livia Laís de Santana Silva^a, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^c, Luiz Alberto Lira Soares^c, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^b, Maira Galdino da Rocha Pitta^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Roberto Araújo Sá^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Inovação Terapêutica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil.*

^c*Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil*

^d*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55604-000 Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil*

RESUMO

Este estudo foi desenhado para avaliar as propriedades antioxidantes e citotóxicas do extrato etanólico das folhas (LEE) e do extrato metanólico do caule (SME) de *Portulaca elatior*. A presença de metabólitos secundários foi determinada por cromatografias líquidas de camada fina e de alta performance. A atividade antioxidante foi analisada in vitro pelos ensaios de DPPH, ABTS e fosfomolibdênio. A citotoxicidade foi avaliada utilizando células leucêmicas e normais. Flavonoides e derivados cinâmicos foram os principais constituintes dos extratos e a atividade antioxidante foi detectada por todos os métodos testados. Os extratos mostraram efeitos antiproliferativos nos valores de K562, MOLT-4 e HL-60 e IC50 determinados para LEE e SME variaram de 8,77 a 9,66 e 5,13 a 8,47 µg/mL, respectivamente. Os extratos (100 µg / mL) não foram citotóxicos em PBMCs e não promoveram hemólise de eritrócitos humanos. O estudo mostrou que a ação citotóxica de LEE e SME pode ser devido à atividade antioxidante de seus metabólitos secundários e que ambos os extratos são potenciais agentes anti-câncer.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Sequestro de radicais livres. Citotoxicidade.

1 Introdução

O câncer, um distúrbio complexo que envolve crescimento celular anormal e com potencial de invadir ou se espalhar para outras partes do corpo, é um dos principais problemas de saúde pública deste século. Essa doença causa mais mortes do que doenças coronárias ou derrames (OMS, 2018). Os procedimentos terapêuticos ainda são insuficientes, apesar dos avanços; eles são altamente invasivos ou inespecíficos, o que pode gerar toxicidade para as células saudáveis. Com o aumento do número de casos, 20 milhões de novos casos de câncer são esperados anualmente em 2025 (Pavet, 2011; OMS, 2018).

Os metabólitos secundários são uma fonte essencial de biomoléculas. Como mais de 95% da biodiversidade do mundo não foi avaliada para nenhuma atividade biológica, o desafio é como acessar e valorizar de maneira eficiente e eficaz essa diversidade química natural (Dewick, 2009; Mishra, 2011; Dubey, 2018). Metabólitos secundários como compostos polifenólicos têm propriedades antioxidantes (Kalisz et al., 2020). Os polifenóis têm a capacidade de retardar ou inibir a etapa de iniciação ou interromper a etapa de propagação da peroxidação lipídica, além de terem sido descritos como agentes antitumorais (Zoofishan et al., 2018; Marset-Castro et al., 2018; Alhamed et al., 2019). Além disso, tem havido um interesse crescente em antioxidantes naturais de origem vegetal, porque eles podem ser usados como nutracêuticos. Além disso, eles também têm maior aplicação na indústria de alimentos para aumentar a estabilidade e o prazo de validade de produtos alimentícios (Sahakyan et al., 2019).

A biodiversidade brasileira inclui espécies de plantas ricas em compostos bioativos. Muitas plantas da Caatinga e seus compostos são descritos por suas propriedades medicinais contra várias doenças (Santos et al., 2009; De Almeida

Andrade et al., 2019). *Portulaca elatior* é uma espécie herbácea que cresce na região da Caatinga e há relatos de que é tóxica para bovinos e caprinos, além de não ter nenhum estudo sobre o seu potencial biotecnológico (Riet-Correa et al., 2017). Este trabalho relata a avaliação dos extratos de folhas e caule de *Portulaca elatior* quanto à presença de metabólitos secundários, atividade antioxidante e citotoxicidade em células humanas normais e de câncer.

2 Materiais e Métodos

2.1 Preparação dos Extratos

P. elatior Mart. ex Rohrb. foi coletado na cidade de Aroeiras, Estado da Paraíba, nordeste do Brasil, com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (número 38690) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. Um espécime de voucher foi arquivado no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brasil, sob o número de registro 90796.

Os extratos foram obtidos conforme descrito por Oliveira et al. (2015). Após a coleta, as folhas e o caule foram secos a 60 °C por 5 dias e depois triturados com um liquidificador. Em seguida, o pó de folhas (100 g) e caule (160 g) foram suspensos em etanol e metanol a 70% (v / v), respectivamente e após repouso (48 h), essas misturas foram agitadas mecanicamente por 48 h, usando um agitador orbital. Os extratos etanólico da folha e metanólico do caule, denominados LEE e SME, respectivamente, foram obtidos após filtração e eliminação de solventes por evaporação rotativa.

2.2 Análise fitoquímica

A cromatografia em camada fina (TLC) foi usada na triagem de LEE e SME para a presença de alcalóides, cumarinas, derivados do ácido cinâmico, flavonoides,

taninos, terpenos / esteróides e açúcares. As placas foram desenvolvidas em um sistema de cromatografia de camada fina (HPTLC) de alto desempenho (CAMAG, Suíça), consistindo de um aplicador de amostras Linomat V equipado com uma seringa de 100 µL (Hamilton, Suíça) conectada ao ar comprimido e o winCATS® software (CAMAG, Suíça). As placas de gel de sílica (60-F254; Merck, Alemanha) foram colocadas em uma câmara vertical de vidro de calha dupla (10 × 10 cm, CAMAG, Suíça), e as placas foram desenvolvidas usando a fase móvel necessária para cada classe de compostos (Markhan, 1982 Wagner e Bladt, 2001). O tempo de saturação para a fase móvel foi de 30 minutos a 25 ± 2 °C. Após o desenvolvimento, as placas foram derivatizadas por pulverização com os reagentes específicos para cada composto da classe e visualizadas sob luz ultravioleta de 254 ou 365 nm. As imagens foram adquiridas usando o sistema de imagem MultiDoc-It™ (Modelo 125, EUA), com o software UVP e uma câmera Canon (Rebel T3, EOS 1100 D).

2.3 *Análises em HPLC*

O LEE e o SME (100 mg) foram dissolvidos em 5 mL de metanol para HPLC (Tedia, EUA) e depois diluídos em água purificada (PURELABs Classic UV, ELGA LabWater, EUA) para obter uma solução de concentração de 5 mg / mL. A análise da HPLC foi realizada em um sistema HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientifics, EUA) acoplado a um detector de díodos (DAD; Thermo Fisher Scientifics) e equipado com uma bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientifics), um desgaseificador e um amostrador automático equipado com um loop de 20 mL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientifics). O comprimento de onda foi fixado em 350 nm para detecção de flavonoides e ácidos cinâmicos. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., tamanho de partícula 5 mm; Dionexs, EUA) equipada com uma coluna de proteção

(C18, 4 mm × 3,9 mm; Phenomenex, EUA). As separações foram realizadas a uma temperatura de 25 °C. A fase móvel consistiu em água purificada (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoracético a 0,05%, a uma vazão ajustada para 0,8 mL / min. Um programa de gradiente foi aplicado da seguinte forma: 0–10 minutos a 5–20% B, 10–13,5 minutos a 20–25% B, 13,5–18 minutos a 25–40% B, 18–25 minutos a 40–80% B, 25-30 minutos a 80% B e 30-34 minutos a 80-5% B. Para análise e processamento dos dados, foi utilizado o software Chromeleon versão 6 (Dionex / Thermo Fisher Scientifics, EUA).

Os padrões - ácido clorogênico, kaempferol, quercetina e rutina (Sigma-Aldrichs, EUA) - foram dissolvidos em metanol para HPLC e diluídos em água purificada para obter soluções com concentrações de 20 mg / mL. Estes foram submetidos para análise nas mesmas condições descritas acima.

2.4 Dosagem de compostos fenólicos e flavonoides

Os métodos padrão de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio foram utilizados para determinar o conteúdo total de fenólicos e flavonoides, respectivamente (Slinkard e Singleton, 1977; Zengin et al., 2016). Os resultados do conteúdo fenólico total foram expressos como equivalentes ao ácido gálico (mg de GAE / g de extrato), enquanto a quantidade do conteúdo total de flavonoides foi registrada como equivalentes de quercetina (mg de QE / g de extrato).

2.5 Ensaio de fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio, conforme descrito por Aguilar Urbano (2013). O ensaio é baseado na redução de Mo (VI) para Mo (V) pela amostra e subsequente formação de um complexo verde de fosfato / Mo (V) a pH ácido. LEE e SME (0,3 mL) e ácido ascórbico (100 µg / mL)

foram combinados com 3 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Uma solução em branco continha 3 mL de solução reagente e DMSO 0,05% em água destilada (0,3 mL) que foi o solvente utilizado para a solubilização dos extratos. Todos os tubos foram tapados e incubados em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após as amostras terem sido resfriadas a 24 °C, a absorbância da solução de cada amostra foi medida a 695 nm contra o branco, usando um espectrofotômetro UV-Vis. O experimento foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante total foi expressa como o número de equivalentes de ácido ascórbico (mg AAE/ g de extrato).

2.6 Ensaio de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade de eliminação de DPPH para estimativa das propriedades de eliminação de radicais livres foi realizada conforme descrito por Shirwaikar, Rajendran e Punithaa (2006). Este método depende da redução de DPPH púrpura a uma difenil-picrilhidrazina de cor amarela e foi medido o DPPH restante que mostrou absorção máxima a 517 nm. LEE e SME (2 mL) em diferentes concentrações foram adicionados a 2 mL de solução de DPPH 0,1 mM. Uma quantidade igual de metanol e DPPH serviu como controle. Após 20 min de incubação a 37 °C no escuro, a absorvância foi registrada a 517 nm. O experimento foi realizado em duplicado. A atividade de eliminação de radicais DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação: % de atividade de eliminação de radicais DPPH = $[A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}] \times 100$ no qual A_{sample} e A_{control} são absorvância da amostra e controle, respectivamente. A atividade de eliminação de DPPH foi expressa como o número de equivalentes de Trolox (mg TE/g extrato).

2.7 Ensaio 2,2-azinobis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)

A atividade de eliminação do ABTS foi determinada pelo método descrito por Re et al. (1999) com pequenas modificações. Resumidamente, a solução ABTS 7 mM foi misturada com persulfato de potássio 2,45 mM (concentração final) e incubada por 12 h no escuro a 24 °C para preparar a solução de trabalho ABTS • +. A solução de trabalho foi diluída com solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) para obter uma absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 732 nm e, em seguida, 1,8 mL foram incubados (1 min a 24 °C) com 0,2 mL da amostra de teste e, posteriormente, a absorvância foi lida a 732 nm. A atividade de eliminação de DPPH foi expressa como o número de equivalentes de Trolox (mg TE/g extrato).

2.8 Atividade citotóxica

O ensaio de citotoxicidade foi avaliado em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e nas linhagens celulares de leucemia mielóide crônica (K562), leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4) e leucemia promielocítica aguda (HL-60). A concentração que inibiu 50% do crescimento celular em comparação com o controle (IC50) foi determinada. As linhas celulares de câncer foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro bovino fetal a 10% (v / v), glutamina 2 mM, penicilina 100 U / mL e estreptomicina 100 µg / mL a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. As células de PBMC foram obtidas do sangue de cinco doadores voluntários saudáveis (Comitê de Ética em Pesquisa em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco - CEP/CCS/UFPE Nº 1.285.288) por centrifugação em gradiente de densidade sobre Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences, Suécia). A viabilidade das células foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano e apenas amostras de células nas quais a viabilidade foi superior a 98% foram utilizadas nas experiências.

PBMCs (100 μ L, 10^6 células / mL), células K562, MOLT-4 e HL-60 (100 μ L, 10^5 células / mL), em meio RPMI 1640 suplementado com 20% (v / v) de soro fetal bovino, 100 U / mL de penicilina, 100 μ g / mL de estreptomicina, foram semeados em placas de 96 poços. Após 24 h, os extratos foram adicionados a cada poço para atingir concentrações variando de 1 a 100 μ g / mL. Após incubação por 72 h, 100 μ L de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, 5,0 mg / mL) foram adicionados a cada poço, conforme descrito por Mosmann (1983) e Alley (1988). Após 3 h, o produto formazan foi dissolvido em dimetilsulfóxido e a absorvância a 540 nm foi medida usando um leitor de microplacas. As células não tratadas e as células tratadas com fosfato de etoposídeo (0,625–10 μ g / mL) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experiências independentes. A concentração que inibiu o crescimento celular em 50% (IC₅₀) foi determinada por análise probit usando o programa SPSS 8.0 (IBM, Nova York, NY, EUA) para Windows.

2.9 Atividade hemolítica

O ensaio foi realizado de acordo com Braga (2015), com algumas modificações. O LEE e o SME foram avaliados quanto à atividade hemolítica por ensaio realizado em microplacas de 96 poços. Cada poço recebeu 100 μ L de uma solução de NaCl a 0,85% contendo 10 mM de CaCl₂. Amostras (100 μ L) de extratos foram adicionadas ao primeiro poço do respectivo tratamento, do qual 100 μ L foram transferidos para o segundo para realizar uma diluição seriada (concentrações finais variando de 0,78 a 100 μ g / mL em solução salina). Em seguida, foram adicionados 100 μ L de uma suspensão a 2% (v / v) de eritrócitos humanos em solução salina contendo 10 mM de CaCl₂. Em controles negativos, foram banhados 100 μ L de solução salina mais 100 μ L de suspensão de eritrócitos. O controle positivo (para

obter 100% de hemólise) continha 80 µL de solução salina mais 20 µL de Triton X-100 a 0,1% em solução salina. Após centrifugação durante 1 h, seguida de incubação por 1 h a 27 ° C, o sobrenadante foi descartado e a hemoglobina liberada foi medida por absorvância a 450 nm. A concentração efetiva que promove 50% da hemólise (EC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicado. o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº 2.478.480).

2.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ou a porcentagem média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Tukey; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 Resultados e Discussão

Os rendimentos de extração dos extratos etanólico da folha (LEE) e metanólico do caule (SME) foram 12,38% e 10,08% respectivamente, e a TLC revelou a presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis e derivados cinâmicos, nos dois extratos, enquanto os alcalóides, antraquinonas, cumarinas e esteróides estavam ausentes. A análise por HPLC de LEE (Fig. 1A) revelou a presença de dois picos cujos tempos de retenção foram de 18,2 min e 23,9 min (pico principal). Os espectros de varredura desses picos mostraram espectros típicos de flavonoides visíveis aos raios UV, com duas bandas de absorbância a 255 - 348 nm e 267 - 328 nm (Fig. 1B e C). O perfil de HPLC para PME (Fig. 2A) mostra vários picos com tempos de retenção de 16,2, 18,2, 19,9 e 23,7 min (pico principal). Os espectros de varredura desses picos mostraram espectros UV-Visíveis típicos de derivados

cinâmicos (Fig. 2B e 2D) e flavonoides (Fig. 2C e 2D) e, com duas bandas de absorvância a 221 - 318nm (derivados cinâmicos) e 255 - 349 nm (flavonoides). Flavonoides e derivados cinâmicos já foram descritos em plantas da família Portulacaceae (Gatea et al., 2017; Du, 2017; Yang et al., 2018) e esses metabólitos secundários mostram várias propriedades biológicas, incluindo antioxidante, anticolinesterase, anti-inflamatório, atividades anticâncer, antialérgicas, anti-hiperglicêmicas, anti-hiperlipidêmicas e antimicrobianas (Lee et al., 2012a; Lee et al., 2012b; Uddin et al., 2012; Du et al., 2017; Desta et al., 2018 ; Yang et al., 2018). Atualmente, devido aos seus efeitos farmacológicos, como antioxidantes, anti-inflamatórios ou anticâncer, os metabólitos secundários das plantas estão ganhando atenção (Locatelli et al., 2017; Uysal et al., 2018; Ghanad et al., 2020). Este é o primeiro estudo utilizando tecidos *Portulaca elatior* em busca de metabólitos secundários com atividades biológicas.

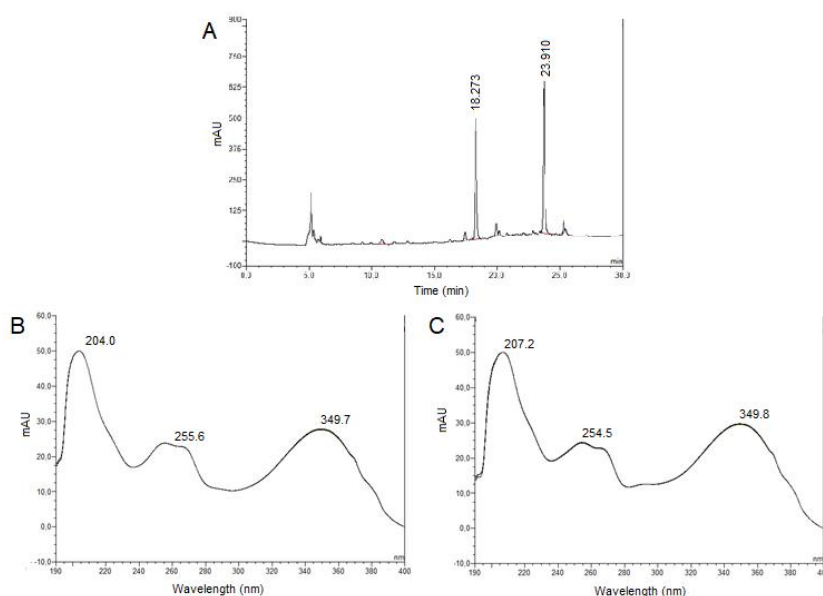


Figura 1. Perfil HPLC de LEE (A). Os espectros de UV dos picos detectados em LEE, Flavonoid 1 (B) e Flavonoid 2 (C).

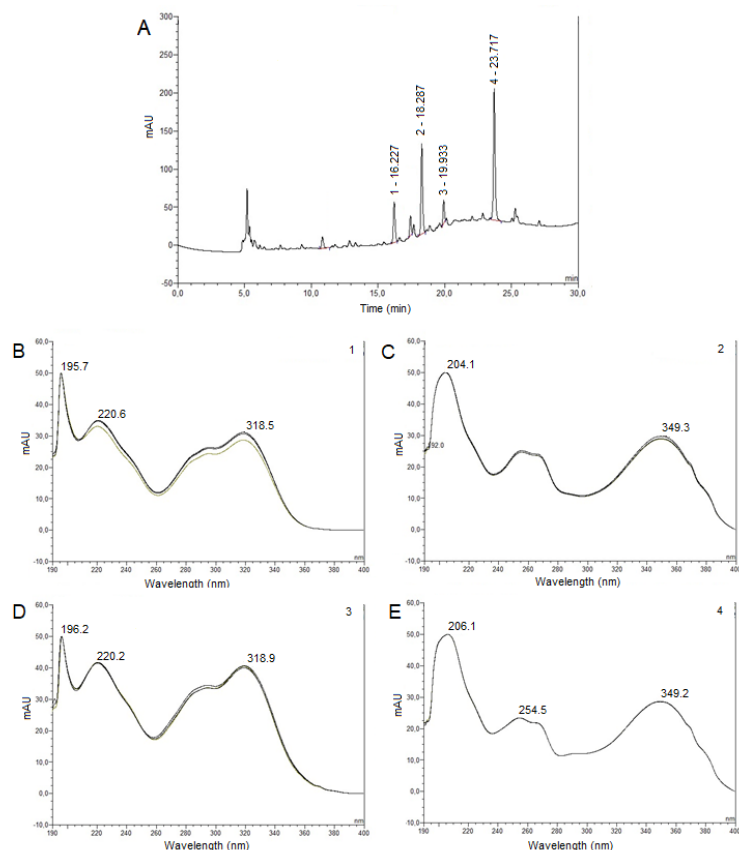


Figura 2. Perfil HPLC da SME (A). Espectros de UV de picos detectados em PME (B, C, D e E). derivados cinâmicos 1 e 2 (B e D); flavonóide 1 e 2 (C e D).

LEE e PME foram boas fontes de compostos fenólicos ($30,81 \pm 0,45$ e $27,48 \pm 0,81$ mg de GAE / g, respectivamente) e flavonoides ($4,73 \pm 0,38$ e $2,56 \pm 0,29$ mg de QE / g, respectivamente) e esse fato nos estimula a avaliar o antioxidante atividade delas, já que moléculas com atividades antioxidantes são usadas para retardar e evitar o processo de oxidação e são capazes de combater os radicais livres, que se estão relacionados a diversas doenças (Abeywickrama et al., 2016; Ahmed Amar et al., 2019).

A atividade antioxidante de LEE e SME foi investigada por três ensaios (Tabela 1), uma vez que o uso de métodos baseados em diferentes abordagens e mecanismos fornece uma visão abrangente do perfil antioxidante da amostra (Ruiz-

Riaguas et al., 2020). A capacidade dos extratos para eliminar os radicais DPPH e ABTS foi significativa quando comparada ao Trolox, a referência utilizada, e mostra o potencial deles para eliminar os radicais livres formados in vitro. O método do fosfomolibdênio é um método simples para determinar o poder antioxidante total da planta (Llorent-Martínez et al., 2017). A atividade antioxidante de LEE e SME pode ser devida à presença de um teor relativamente alto de flavonoides nos extratos. Os extratos orgânicos contendo fenólicos e flavonoides foram os mais ativos na eliminação de radicais livres. O alto teor de fenólicos e flavonoides tem sido correlacionado com a capacidade antioxidante de extratos vegetais (Amessis-Ouchemoukh et al., 2017; Zengin et al., 2018; Nardini et al., 2020).

Tabela 1. Propriedades antioxidantes dos extratos de *P. elatior*

Amostra	Sequestro de Radicais Livres		Capacidade antioxidante total
	DPPH (mg TE/g extrato)	ABTS (mg TE/g extrato)	Fosfomolibdênio (mg AAE/g extrato)
LEE	85.7±0.002	79.14 ± 2.62	1.25±0.73
SME	83.8±0.001	57.73 ± 1.85	0.93±0.29

TE: trolox equivalente; AAE: ácido ascórbico equivalente. Todos os valores expressos são médias ± S.D. de três medições paralelas.

Flavonoides e derivados cinâmicos são relatados como agentes anticâncer (Li et al., 2014; Durga et al., 2014; Vallianou et al., 2015; Endo et al., 2018) e esse fato nos estimulou a determinar os efeitos de LEE e PME na viabilidade de células cancerígenas (Tabela 2). Ambos os extratos apresentaram atividades antitumorais significativas contra as células tumorais testadas e essa propriedade biológica pode estar relacionada à atividade antioxidante das mesmas. Reuter et al. (2010)

relataram que altos níveis de espécies reativas de oxigênio detectadas em melanoma, leucemias e carcinomas gástricos, prostáticos, mamários e de cólon podem ser eliminados por compostos antioxidantes. Também foi relatada a existência de relação entre a estrutura química dos flavonoides e suas propriedades anticâncer (Scotti et al., 2002). Por exemplo, a atividade antitumoral dos flavonoides depende do número e posição dos grupos hidroxila, grupos metoxi e presença de dupla ligação C-C no anel-B dos flavonoides (Silva et al., 2011).

Tabela 2. Citotoxicidade em células tumorais de extratos de *P. elatior*

Amostra	Citotoxicidade		
	K562	MOLT-4	HL-60
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
SME	8.47±2.72	5.13±3.78	7.9±3.11
LEE	9.01±0.67	8.77±0.78	9.66±1.20

K562, leucemia mielóide crônica; MOLT-4, leucemia linfoblástica aguda e HL-60, leucemia promielocítica aguda. IC₅₀, concentração que inibiu 50% do crescimento celular em comparação com o controle.

Foram avaliados os efeitos de LEE e SME em PBMCs e eritrócitos humanos (Tabela 3). É importante investigar o efeito sobre PBMC e eritrócitos, porque a redução da viabilidade celular normal e hemólise é indesejável quando se trata de moléculas com atividade biológica considerável (Santos et al., 2016). Os extratos até 100 µg / mL não reduziram a viabilidade das PBMCs e as porcentagens máximas de hemólise causadas por elas indicam baixa atividade hemolítica (Braga, 2015).

Tabela 3. Toxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano e eritrócitos humanos de extratos de *P. elatior*

Amostra	Citotoxicidade	Atividade hemolítica	
	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	Hmax (%)
LEE	>100	>100	3.73±0.08
SME	>100	>100	1.56±0.29

IC₅₀, concentração que inibiu 50% do crescimento celular em comparação com o controle. EC₅₀, concentração eficaz que promove 50% da hemólise. Hmax, porcentagem de hemólise.

4 Conclusão

LEE e SME contendo como compostos principais são agentes antioxidantes e anticâncer que não reduzem a viabilidade das células humanas normais ou causam hemólise.

Os resultados do presente estudo mostraram que LEE e SME apresentam flavonoides e derivados cinâmicos como compostos majoritários, além de se apresentarem como agentes antioxifantes e citotóxicos contra células tumorais sem reduzir a viabilidade das células saudáveis e nem provocar hemólise. Esses dados destacam a importância biotecnológica de *P. elatior*.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por bolsas e bolsas de pesquisa (PMG Paiva), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

(FACEPE) para bolsas de pesquisa. Os autores agradecem a Carlos Eduardo Sales da Silva pela assistência técnica.

Referências

- ABEYWICKRAMA, Gihan et al. Phenolics of selected cranberry genotypes (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their antioxidant efficacy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 49, p. 9342-9351, 2016.
- AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1394-1398, 2011.
- AGUILAR URBANO, Miguel; PINEDA PRIEGO, Manuel; PRIETO, Pilar. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. 2013.
- AHMED AMAR, Safa Ali et al. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **The Aging Male**, v. 22, n. 3, p. 198-206, 2019.
- ALHAMED, Samiyah et al. Triphenylmethanol Conjugates of Triptorelin as Anti-Lipid Peroxidation Prodrugs. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 03, p. 49, 2019.
- ALLEY, Michael C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, v. 48, n. 3, p. 589-601, 1988.
- ALVES, Daniela Ribeiro et al. Flavonoid composition and biological activities of ethanol extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a native plant from caatinga biome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- ALVES, Jose Jakson. Geoecologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro. **CLIMEP-Climatologia e Estudos da Paisagem**, v. 2, n. 1, 2007.
- AMESSIS-OUCHEMOUKH, Nadia et al. Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 6-17, 2017.
- BASAK, Piyali; PAUL, Samrat; MAJUMDER, Ranabir. Invitro cytotoxic study of aloe vera whole leaf extract on PBMC and breast cancer cell line. In: **2017 2nd International Conference for Convergence in Technology (I2CT)**. IEEE, 2017. p. 124-127.

BRAGA, Alana Araújo et al. Antibacterial and hemolytic activity of a new lectin purified from the seeds of *Sterculia foetida* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1689-1699, 2015.

BURCI, Lígia Moura et al. Acute and subacute (28 days) toxicity, hemolytic and cytotoxic effect of *Artocarpus heterophyllus* seed extracts. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1304-1308, 2019.

CHOWDHURY, D. R.; CHATTOPADHYAY, SWAPAN KUMAR; ROY, SUBHASH KANTI. Assessment of secondary metabolites with relation to their antioxidant activity of fungal endophytes isolated from medicinal plants. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 10, p. 59-63, 2018.

DAMASCENO, Gabriel Azevedo; FERRARI, Marcio; GIORDANI, Raquel Brandt. *Prosopis juliflora* (SW) DC, an invasive specie at the Brazilian Caatinga: phytochemical, pharmacological, toxicological and technological overview. **Phytochemistry reviews**, v. 16, n. 2, p. 309-331, 2017.

DE ALMEIDA ANDRADE, Bruno et al. Photoprotective activity of medicinal plants from the caatinga used as anti-inflammatories. **Pharmacognosy Magazine**, v. 15, n. 61, p. 356, 2019.

DESTA, Zelalem Yibralign; CHERIE, Desie Alemaw. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of the extracts of aerial parts of *Portulaca quadrifida*. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 146, 2018.

DU, Yong-Kai et al. Flavonoids extract from *Portulaca oleracea* L. induce *Staphylococcus aureus* death by apoptosis-like pathway. **International journal of food properties**, v. 20, n. sup1, p. S534-S542, 2017.

DUBEY, Surbhi; SAO, Shweta. Antimicrobial Activity of Crude Stem Extracts of Some Medicinal Plants against Skin Disease Causing Microbes from Chhattisgarh Region. 2018.

DURGA, M.; NATHIYA, S.; DEVASENA, T. Immunomodulatory and antioxidant actions of dietary flavonoids. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 50-6, 2014.

ENDO, Satoshi et al. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artepillin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 497, n. 1, p. 437-443, 2018.

GATEA, Florentina et al. Chemical constituents and bioactive potential of *Portulaca pilosa* L vs. *Portulaca oleracea* L. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 7, p. 1516-1527, 2017.

GHANAD, M. et al. Comparative Study on Antioxidant Activity of *Brassica rapa* var. *parachinensis* Leaves and Seeds. 2020.

GIUSTI, Federica et al. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food chemistry**, v. 221, p. 689-697, 2017.

GUPTA, A.; *et al.* **Immunosuppressive and Cytotoxic Potential of Flavonoids from Medicinal Plants: Preliminary Investigation for Anticancer Activity.** *Int J Immunother Cancer Res*, 2017. 3(1): 007-0011.

KALISZ, Stanisław *et al.* Effect of a variety of polyphenols compounds and antioxidant properties of rhubarb (*Rheum rhabarbarum*). **LWT**, v. 118, p. 108775, 2020.

KERCHE-SILVA, Leandra Ernst *et al.* Free-radical Scavenging properties and Cytotoxic Activity Evaluation of Latex C-serum from *Hevea brasiliensis* RRIM 600. **Free Radicals & Antioxidants**, v. 7, n. 1, 2017.

LEE, An Sook *et al.* Anti-TNF- α activity of *Portulaca oleracea* in vascular endothelial cells. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 5, p. 5628-5644, 2012a.

LEE, An Sook *et al.* *Portulaca oleracea* ameliorates diabetic vascular inflammation and endothelial dysfunction in db/db mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012b.

LI, Y.; *et al.* **Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications.** *Cancer Lett.*, 2014. 346: 197-205.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. *et al.* Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: potential sources of bioactive compounds for the food industry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 609-619, 2017.

LOCATELLI, Marcello *et al.* Optimization of aqueous extraction and biological activity of *Harpagophytum procumbens* root on ex vivo rat colon inflammatory model. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 937-944, 2017.

MARSET-CASTRO, Azucena *et al.* Phenolic peptides as antioxidant and anti-proliferative agents. **Journal of Molecular and Clinical Medicine**, v. 1, n. 4, p. 237-248, 2018.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NARDINI, Mirella; GARAGUSO, Ivana. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food chemistry**, v. 305, p. 125437, 2020.

NASCIMENTO, Viviany Teixeira *et al.* Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2112-2119, 2011.

PAVET, V. *et al.* Towards novel paradigms for cancer therapy. **Oncogene**, v. 30, n. 1, p. 1-20, 2011.

RAMIREZ-VARGAS, Marco Antonio et al. Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells. **Environmental toxicology**, v. 32, n. 1, p. 147-155, 2017.

RAO, Shiwangni et al. Characterization of phenolic compound antioxidant activity in oat varieties using UHPLC–online ABTS and LC Q-TOF. **Cereal Chemistry**, v. 96, n. 5, p. 958-966, 2019.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REUTER, Simone et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology and medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RUIZ-RIAGUAS, A. et al. Phenolic Profile, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Properties of *Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze and *Limonium quesadense* Erben. **Journal of Chemistry**, v. 2020, 2020.

SAHAKYAN, Naira et al. Plant Origin Phenolics as Prospective Antioxidants: State-of-Art for Application. In: **1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019)**. Atlantis Press, 2019.

SANTOS, Andrea FS et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.

SANTOS, Danyelle Khadydja F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SCOTTI, Luciana et al. SAR, QSAR and docking of anticancer flavonoids and variants: a review. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 24, p. 2785-2809, 2012.

SELVARAJ, K.; CHOWDHURY, Ranjana; BHATTACHARJEE, Chiranjib. Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity. **Int J Pharm Sci**, v. 5, n. 3, p. 743-9, 2013.

SHIRWAIKAR, Annie et al. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1906-1910, 2006.

SILVA, Cassiane et al. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, 2011.

SULTANA, Bushra et al. Effect of drying techniques on the total phenolic. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 1, p. 161-167, 2012.

UDDIN, Md et al. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 8, p. 10257-10267, 2012.

UYSAL, Şaban; KOÇ, Ziya Erdem. The synthesis and characterization of (MSalen/salophen/saldeta/salpy)[M= Fe (III) or Cr (III)] capped heteromultinuclear schiff bases-dioxime Ni (II) complexes: their thermal and magnetic behaviours. **Journal of Molecular Structure**, v. 1165, p. 14-22, 2018.

VALLIANOU, Natalia G. et al. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin. **Anticancer research**, v. 35, n. 2, p. 645-651, 2015.

WANG, Huailing et al. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). **Food chemistry**, v. 217, p. 773-781, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global health observatory data repository**. 2018. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en>. Last accessed 22 April 2018.

XIE, Yixi et al. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

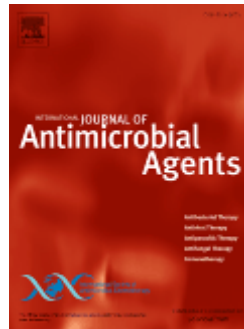
YANG, Xu et al. New flavonoids from *Portulaca oleracea* L. and their activities. **Fitoterapia**, v. 127, p. 257-262, 2018.

ZENGİN, Gokhan et al. Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasiaca*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 11-21, 2018.

ZOOFISHAN, Zoofishan; HOHMANN, Judit; HUNYADI, Attila. Phenolic antioxidants of *Morus nigra* roots, and antitumor potential of morusin. **Phytochemistry reviews**, v. 17, n. 5, p. 1031-1045, 2018.

3.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS, SINÉRGICAS E ANTI-VIRULÊNCIA DA LECTINA DA RAIZ DE *PORTULACA ELATIOR* CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “International Journal of Antimicrobial Agents”



Fator de Impacto: 4.615

Avaliação das atividades antibacterianas, sinérgicas e anti-virulência da lectina da raiz de *Portulaca elatior* contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

José Dayvid Ferreira da Silva^a, Maiara Celine de Moura^a, Suellen Pedrosa da Silva^a, Pollyana Michele da Silva^a, Wênio Sandoval Filho Lima da Silva^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Roberto de Araújo Sá^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Hanne Ingmer^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}.

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55604-000 Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil*

^c*Department of Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, Denmark*

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

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

RESUMO

As lectinas vegetais são proteínas que interagem com microrganismos promovendo respostas celulares, incluindo diminuição do crescimento e sobrevivência. A lectina isolada de raízes de *Portulaca elatior* (PeRoL) possui ação antimicrobiana contra patógenos humanos. Neste trabalho, avaliou-se a atividade antibacteriana do PeRoL contra isolados de *Staphylococcus aureus* não resistentes (8325-4), resistentes à oxacilina (UFPEDA-670) e resistentes à meticilina (MRSA; LAC USA300). Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (MIC) e bactericidas mínimas (MBC) e o efeito na cinética de crescimento bacteriano. Além disso, foram determinados os efeitos sinérgicos entre PeRoL e antibióticos contra os três isolados. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da lectina na agregação bacteriana e atividade hemolítica. Finalmente, a influência do PeRoL na expressão de genes de virulência (*hla*, *rnaIII* e *spa*) também foi investigada. PeRoL apresentou atividade bactericida contra 8325-4 (MIC e MBC de 20 µg / mL), UFPEDA-670 (MIC e MBC de 5 e 40 µg / mL, respectivamente) e LAC USA300 (MIC e MBC de 5 e 40 µg / mL, respectivamente), interferindo na cinética de crescimento de todas as cepas. Efeito sinérgico foi detectado com cefoxitina e cefotaxima e efeitos antiagregantes também foram detectados na cepa 8325-4. No entanto, a lectina não interferiu na atividade hemolítica nem na expressão dos genes *hla*, *rnaIII* e *spa*. Em conclusão, o PeRoL apresenta atividade antibacteriana contra isolados suscetíveis e resistentes e com potencial para melhorar a ação dos antibióticos.

Palavras-chave: Antibioticos, expressão gênica, oxacilina-resistant, meticilina-resistente.

1 Introdução

Os microrganismos patogênicos causam várias doenças infecciosas e podem até levar à morte. Apesar do desenvolvimento de novas vacinas e antibióticos contra doenças infecciosas, patógenos multirresistentes estão surgindo continuamente (Gootz, 2010; Dai et al., 2019). Esse fato estimula a busca por novas moléculas bioativas para o controle de patógenos para serem utilizadas isoladamente ou como agentes aditivos ou sinérgicos em terapias combinadas, juntamente com os antibióticos atualmente disponíveis (Bollenbach, 2015; Loose et al., 2019).

A resistência antimicrobiana é um importante mecanismo de sobrevivência que favorece os microorganismos no processo de infecção. Em bactérias, alguns dos mecanismos de resistência molecular e bioquímica envolvem inativação ou modificação de drogas por enzimas, desenvolvimento de bombas de efluxo, mudanças na permeabilidade da membrana e mudanças estruturais nas barreiras e alvos antibióticos (Madigan et al., 2010; Li et al., 2015). A tolerância que alguns patógenos desenvolvem contra antimicrobianos leva a infecções humanas agudas, persistentes, crônicas e recorrentes (Starkey et al., 2014). A resistência de *Staphylococcus spp.* à meticilina está associada a alterações no local de ação da droga pela síntese de uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade (PBP2a) e é mediada pelo gene *mecA* (Sawant et al., 2009; Baig et al., 2019; Delorme et al. al., 2019). A presença de bombas de efluxo na membrana plasmática dessas bactérias permite a extrusão de compostos tóxicos para o meio externo e é o mecanismo responsável pela resistência de microrganismos a diferentes classes de antimicrobianos de interesse clínico (Webber et al., 2003; Kumar et al., 2020).

O grau de patogenicidade de um microrganismo depende diretamente de seus fatores de virulência, que correspondem a mecanismos que aumentam a

capacidade de causar uma infecção (Nash et al., 2015). Esses mecanismos incluem estruturas, estratégias ou a produção de substâncias que auxiliam o microrganismo na invasão dos tecidos e evasão das defesas do sistema imunológico. Por exemplo, a formação de biofilmes é uma estratégia notória pela qual os microrganismos melhoram sua resistência (Reis et al., 2014; Cepas et al., 2019).

Os produtos naturais compreendem uma diversidade de moléculas bioativas que têm sido avaliadas como potenciais agentes terapêuticos inovadores, desempenhando um papel extremamente importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Newman et al., 2012). Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados com alta especificidade (Gabius et al., 2016; Bhutia et al., 2019).

A lectina da raiz de *Portulaca elatior* (PeRoL) é uma proteína homodimérica com 32 kDa e ponto isoelétrico 3.8 que reconhece carboidratos e glicoproteínas e reduz o crescimento microbiano e a sobrevivência de patógenos humanos (Silva et al., 2019). Este trabalho determinou a atividade antibacteriana do PeRoL contra isolados suscetíveis (8325-4), resistentes à oxacilina (UFPEDA-670) e resistentes à meticilina (MRSA; LAC USA300) de *Staphylococcus aureus*. A viabilidade celular, a curva de crescimento e as mudanças na ultraestrutura celular foram avaliadas. Além disso, foram determinados os efeitos das combinações lectina-antibiótico no crescimento microbiano e o efeito do PeRoL na expressão dos fatores de virulência.

2 Materiais e métodos

2.1 Isolamento da lectina

PeRoL foi isolado de raízes de *P. elatior* Mart. ex Rohrb conforme descrito por Silva et al., (2019). Os espécimes foram coletados em Aroeiras (Paraíba, Brasil) com

autorização (36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. O pó das raízes de *P. elatior* foi obtido após ser triturado em um liquidificador e, em seguida, misturado com NaCl 0,15 M (na proporção de 10:1, p/v) por 6 h usando um agitador magnético. A seguir, a mistura foi filtrada e centrifugada ($9000 \times g$, 15 min, 4 °C) para obtenção do extrato salino. O extrato foi aplicado (8,0 mg de proteína) em uma coluna de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com 0,15 M de NaCl. A lectina adsorvida na coluna foi recuperada por eluição com ácido acético 1,0 M e dialisada contra água destilada (6 h) para remoção do eluente.

2.2 Concentração de proteína e ensaio de hemaglutinação

A concentração de proteínas foi estimada de acordo com Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (31,25 a 500 μg / mL). A atividade hemaglutinante (HA) foi investigada segundo Paiva e Coelho (1992). A amostra (50 μL) foi diluída em série duas vezes em NaCl 0,15 M e, em seguida, 50 μL de uma suspensão (2,5% v / v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (Bing et al., 1967) foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada a 27 °C durante 45 min. No controle, a suspensão de eritrócitos foi incubada com NaCl 0,15 M. O número de unidades de HA (HAU) foi determinado como o recíproco da maior diluição da amostra que promoveu aglutinação total de eritrócitos de coelho. O HA específico foi definido como a razão entre o HAU e a concentração de proteína (mg / mL).

2.3 *Isolados bacterianos*

Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* 8325-4 (não resistente a antibióticos, NCTC 8325; Novick, 1967) e LAC USA300 (MRSA, FPR3757; Diep et al., 2006) foram obtidos no Departamento de Ciências Veterinárias e Animais, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Universidade de Copenhague (Dinamarca). O isolado resistente à oxacilina UFPEDA-670 foi fornecido pela coleção de cultura da UFPEDA (WDCM 114) do Departamento de Antibióticos da UFPE. As cepas de *S. aureus* PC322, hla :: lacZ (Chan e Foster, 1998), PC203, spa :: lacZ (Chan e Foster, 1998) e SH101F7, rnalII :: lacZ (Horsburgh et al., 2002) também foram usadas. As culturas de estoque foram mantidas a -80 °C em Caldo Mueller Hinton (MHB) estéril com 10% (v / v) de glicerol. Para uso nos ensaios, as bactérias foram cultivadas em Agar Mueller Hinton (MHA) *overnight* a 37 ° C e depois cultivadas em Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid) a 37 ° C sob agitação a 200 rpm. A densidade da cultura foi ajustada turbidimetricamente a 600 nm (OD600) para 1×10^8 unidades formadoras de colônias (CFU) por mL (0,5 na escala de McFarland) em NaCl 0,15 M estéril.

2.4 *Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) e bactericidas mínimas (MBC)*

Os valores de MIC foram determinados para PeRoL (concentração inicial: 250 µg/mL) e os antibióticos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) cefotaxima e ceftiofeno (concentração inicial: 160 µg/mL) pelo método de microdiluição em caldo em microplacas com 96 poços. Os inóculos bacterianos foram diluídos em solução salina para 10^6 UFC / mL. Primeiro, 80 µL de água destilada foram adicionados do segundo até o décimo segundo poço da linha e, em seguida, PeRoL (80 µL; 0,5 mg /

mL) foi adicionado ao terceiro poço e submetido a uma diluição em série de duas vezes até o décimo segundo poço. Em seguida, 40 µL de MHB foram adicionados a todos os poços da fileira, exceto o primeiro, que foi preenchido com 200 µL do meio de cultura e serviu como controle de esterilidade. Por fim, a suspensão bacteriana (80 µL; 10^6 UFC/mL) foi adicionada do segundo ao décimo segundo poço. O segundo poço (contendo o microrganismo na ausência da lectina) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. O OD₆₀₀ foi medido usando um leitor de microplaca no tempo zero e após 24 h a 37 °C. O MIC foi definido como a menor concentração de lectina / antibiótico capaz de promover redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação com o controle de crescimento de 100%.

Para a determinação do MBC, alíquotas (10 µL) dos poços contendo concentrações de lectina $\geq$ MIC foram inoculadas em placas de petri contendo MHA, que foram incubadas por 24 h a 37 °C. O MBC correspondeu à menor concentração de lectinas capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi conduzido em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

2.5 **Curvas de crescimento**

Foram estabelecidas curvas de crescimento de 24 horas, na ausência ou presença de PeRoL, de 8325–4, LAC USA300 e UFPEDA 670. O ensaio foi realizado conforme descrito na seção 2.4: o primeiro poço correspondia ao controle de esterilidade; o segundo poço correspondeu ao controle de 100% de crescimento; o terceiro ao sexto poços corresponderam a tratamentos com PeRoL a $4 \times$ MIC, $2 \times$ MIC, MIC, $1/2 \times$ MIC e $1/4 \times$ MIC. A microplaca foi incubada a 37 °C e a DO₆₀₀ determinada a cada hora. Três experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 *Ensaio de sinergismo*

Os efeitos sinérgicos entre o PeRoL e os antibióticos que se mostraram ineficazes isoladamente (cefotaxima e cefoxitina) foram avaliados pelo método descrito por Ferreira et al. (2018). Cada experiência correspondeu a duas filas de uma microplaca de 96 poços. A lectina foi adicionada (80 μ L a 8 $\times$ MIC) ao quarto poço da primeira linha e uma diluição seriada de duas vezes em água Milli-Q estéril foi realizada até o penúltimo poço da segunda linha. Em seguida, o antibiótico foi adicionado (80 μ L a 4 $\times$ MIC) ao penúltimo poço da segunda fileira e uma diluição em série de duas vezes foi realizada na direção oposta até o quarto poço da primeira fileira. O terceiro poço da primeira linha continha apenas a lectina (4 $\times$ MIC) e o último poço da segunda linha continha apenas o antibiótico (4 $\times$ MIC). 40 μ L de MHB foram adicionados a todos os poços, exceto o primeiro, que continha 200 μ L de meio de cultura e serviu como controle de esterilidade. O segundo poço correspondeu ao controle de 100% de crescimento. Cada poço, exceto o primeiro, foi inoculado com suspensão bacteriana (80 μ L a 10^6 UFC / mL) e a placa foi incubada a 37 °C. A OD₆₀₀ foi determinada no tempo zero e após 24 h. A avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi realizada através da determinação da soma das concentrações inibitórias fracionárias (Σ FIC), como segue: Σ FIC = (MIC de lectina em combinação / MIC de lectina sozinha) + (MIC de antibiótico em combinação / MIC de antibiótico sozinha). As combinações foram classificadas como sinérgicas (Σ FIC $\leq$ 0,5), aditivas (Σ FIC $>$ 0,5-1,0), indiferentes (Σ FIC $>$ 1,0 – $\leq$ 4,0) ou antagônicas (Σ FIC $>$ 4,0).

2.7 **Ensaio de agregação bacteriana**

A cultura bacteriana em uma OD₆₀₀ inicial = 0,02 foi inoculada em MHB (1 mL por poço) em uma placa de 24 poços. PeRoL, diluído em água Milli-Q estéril, foi adicionado aos poços para obter as concentrações finais correspondentes a $\frac{1}{2}$ ×MIC e MIC. Água Milli-Q foi usada no controle. As placas foram incubadas durante 8,5 h a 37 ° C sob agitação suave. Em seguida, as culturas foram sedimentadas por 30 min e os sobrenadantes foram coletados para determinação de DO₆₀₀. Uma OD₆₀₀ inferior no sobrenadante era indicativa de agregação. Três experimentos foram realizados em triplicata.

2.8 **Ensaio de atividade hemolítica**

A atividade hemolítica de isolados de *S. aureus* tratados ou não com as lectinas foi determinada conforme descrito anteriormente por Silva et al., (2019). Foi usado sangue de ovelha na solução de Alsever adquirida da Vision Médica (Recife, Brasil). Colônias de *S. aureus* foram inoculadas em tubos contendo TSB (5 mL) e mantidas por 16 h a 37 °C em incubadora com agitação (225 rpm). Em seguida, as culturas foram diluídas (1: 9, v/v) em NaCl 0,15 M duas vezes e a suspensão celular final (DO₆₀₀ = 0,15) foi transferida para placas de Petri (90 × 100 mm) e misturada com ágar sangue. Após a solidificação, orifícios foram feitos nas placas e 50 µL de água destilada (controle), PeRoL (a $\frac{1}{2}$ ×MIC, $\frac{1}{4}$ ×MIC e $\frac{1}{8}$ ×MIC) foram adicionados aos orifícios e as placas foram incubadas por 24h a 37 °C. Observou-se o aparecimento de halo de hemólise. Três experimentos foram realizados em triplicata.

2.9 *Ensaio de biofilme*

As culturas de *S. aureus* foram ajustadas para 0,5 na escala de McFarland em NaCl 0,15 M estéril. O inóculo bacteriano (80 μ L) foi incubado com água Milli-Q estéril (80 μ L) e MHB (40 μ L) por 24 h a 37 °C sem agitação em uma placa de microtitulação de 96 poços. Após este período, o conteúdo do poço (células médias e planctônicas) foi removido e o biofilme formado foi tratado com 80 μ L de água Milli-Q estéril (controle negativo), PeRoL, cefotaxima ou cefoxitina. As lectinas e antibióticos foram avaliados isoladamente, bem como em combinações sinérgicas / aditivas. As placas foram incubadas novamente por 24 h a 37 °C e, após esse período, os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril. Os biofilmes restantes foram fixados por calor a 60 °C por 60 min e corados com 0,4% (p / v) de violeta de cristal por 15 min a 25 °C. Os poços foram lavados com água e o corante que se ligou ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto, e a absorbância medida a 570 nm. Três experimentos foram realizados em triplicata.

2.10 *Ensaio qualitativo de β -galactosidase*

A possível influência do PeRoL na expressão dos fatores de virulência controlados pelo sistema agr foi avaliada pelo ensaio da placa de β -galactosidase de acordo com Bojer et al. (2017). Em primeiro lugar, a cepa 8325-4 foi usada para obter sobrenadantes contendo peptídeos autoindutores (AIP). A bactéria foi inoculada em 5 mL de TSB em tubos de 15 mL e incubada durante a noite (16 h) a 37 °C sob agitação a 225 rpm. Após esse período, as culturas foram centrifugadas (10.000 $\times$ g, 5 min) e os sobrenadantes foram passados por filtros estéreis de 0,22 μ m.

Nos ensaios da placa de β -galactosidase, foram utilizadas as cepas transportadoras de fusão PC203 (*spa* :: *lacZ*), PC322 (*hla* :: *lacZ*) e SH101F7 (*rnalIII*

:: lacZ). As bactérias foram cultivadas separadamente em TSB *overnight* para atingir uma densidade de 10^5 UFC / mL. A cultura foi então inoculada (800 μ L) em placas de Petri quadradas contendo Ágar Triptona de Soja fundido, resfriado (45 min) a 45 ° C e suplementado com 5 μ g / mL de eritromicina e 150 μ g / mL de 5-bromo-4-cloro - 3-indolil- β -galactopiranosídeo (X-gal). Furos em cada placa foram feitos com uma broca de cortiça estéril e os tampões de ágar foram removidos. A lectina (para atingir $\frac{1}{2} \times$ MIC, $\frac{1}{4} \times$ MIC, $\frac{1}{8} \times$ MIC e $\frac{1}{16} \times$ MIC) e o sobrenadante contendo AIP (20 μ L) foram adicionados a cada poço. Água Milli-Q foi usada no controle negativo. No controle positivo, foi adicionado o sobrenadante de uma cultura de *Staphylococcus schleiferi* 30743, uma cepa com efeito inibitório no sistema agr (Canovas et al., 2016). As amostras foram difundidas no ágar e as placas foram incubadas a 37 ° C até o desenvolvimento da cor azul derivada da hidrólise de X-gal. As placas foram inspecionadas visualmente quanto a qualquer regulação para cima ou para baixo de cor.

2.11 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média ou a média percentual $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste de intervalo de Tukey; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 Resultados e Discussão

PeRoL exibiu atividade bactericida contra todas as bactérias testadas, incluindo cepas que são resistentes aos antimicrobianos convencionais, como a metilicina. O MIC do PeRoL, necessário para inibir o crescimento das cepas 8325-4, LAC USA300 e UFPEDA-670, foram 20,0, 5,0 e 5,0 μ g / mL, respectivamente (Tabela 1). A atividade antibacteriana do PeRoL contra LAC USA300 foi superior

(MIC 13 vezes menor para PeRoL) aos antibióticos comerciais cefotaxima (MIC de 64 µg / mL) e cefoxitina (MIC de 64 µg / mL). Os valores de MIC determinados para PeRoL contra LAC USA300 e UFPEDA-670 foram menores do que os encontrados para a cepa suscetível de *S. aureus* (ATCC 6538) relatados em estudo publicado anterior usando PeRoL (Silva et al., 2019). PeRoL interferiu na sobrevivência de 8325-4, as cepas LAC USA300 e UFPEDA-670 e MBC encontrados foram 20,0, 40,0 e 40,0 µg / mL, respectivamente, enquanto a cefotaxima e a cefoxitina não mostraram atividade bactericida contra as cepas LAC USA300 e UFPEDA-670. PeRoL foi um agente bactericida contra isolados de *S. aureus* mais eficiente do que lectinas de plantas isoladas de *Dyopsis decaryi*, *Cladonia verticillaris*, *Moringa oleifera* e *Punica granatum* que apresentaram MBC > 1500, 459,9, 300 e 50 µg / mL, respectivamente (Ferreira et al., 2011; Ramos et al., 2014; Torres, 2019; Silva et al., 2019).

Tabela 1. Atividade antibacteriana de PeRoL e drogas comerciais contra *Staphylococcus aureus* isolados 8325-4 (não resistentes), LAC USA300 (MRSA) e UFPEDA 670 (resistente à oxacilina).

Composto	8325-4		LAC USA300		UFPEDA 670	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
PeRoL	20.0	20.0	5.0	40.0	5.0	40.0
Cefotaxime	2.0	4.0	64.0	ND	8.0	ND
Cefoxitin	1.0	64.0	64.0	ND	32.0	ND

MIC and MBC: concentrações inibitórias e bactericidas mínimas, respectivamente, expressas em µg / mL. ND: não detectado.

As bactérias possuem ácidos teicóico e teicurônico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos em suas paredes celulares, que podem interagir com lectinas e podem causar diversos efeitos como formação de poros na parede celular, inibição do crescimento, morte por extravasamento do conteúdo celular, absorção de nutrientes, indução de estresse oxidativo e alteração da permeabilidade da membrana (Paiva et al., 2010; Carvalho et al., 2015; Procópio et al., 2017).

O PeRoL apresentou atividade antibacteriana contra cepas resistentes à meticilina e à oxacilina que exibem resistência a várias classes de antibióticos comerciais, incluindo cefalosporina, tetraciclina, β -lactâmicos, macrolídeos e lincosamidas; esses resultados indicam que é improvável que ocorra resistência cruzada entre esses antibióticos e o PeRoL.

A fim de monitorar a cinética de tempo-morte, as curvas de crescimento de 8325-4 (Figura 1A), LAC USA300 (Figura 1B) e UFPEDA 670 (Figura 1C) foram incubados com PeRoL em diferentes concentrações foram estabelecidas. O crescimento das três linhagens foi inibido a partir da quarta hora de incubação em todos os tratamentos com PeRoL, denotando forte efeito bacteriostático. Para a cepa 8325-4, o crescimento na presença de PeRoL começou apenas na quarta hora com $1/4 \times \text{MIC}$, na quinta hora com $1/2 \times \text{MIC}$, e na décima hora com MIC e com $2 \times \text{MIC}$. Para LAC USA300, não houve crescimento significativo com os tratamentos $1/2 \times \text{MIC}$ e $1/4 \times \text{MIC}$ até a nona e décima primeira hora, respectivamente, e com a concentração de MIC e $2 \times \text{MIC}$ até a décima primeira e décima segunda horas, respectivamente. Para UFPEDA 670, não houve crescimento significativo com os tratamentos $1/2 \times \text{MIC}$ e $1/4 \times \text{MIC}$ até a sétima e nona hora, respectivamente, e com a concentração de MIC e $2 \times \text{MIC}$ até a décima quarta e décima quinta horas, respectivamente. Em $4 \times \text{MIC}$, nenhum crescimento foi detectado para ambas as cepas ao longo do ensaio.

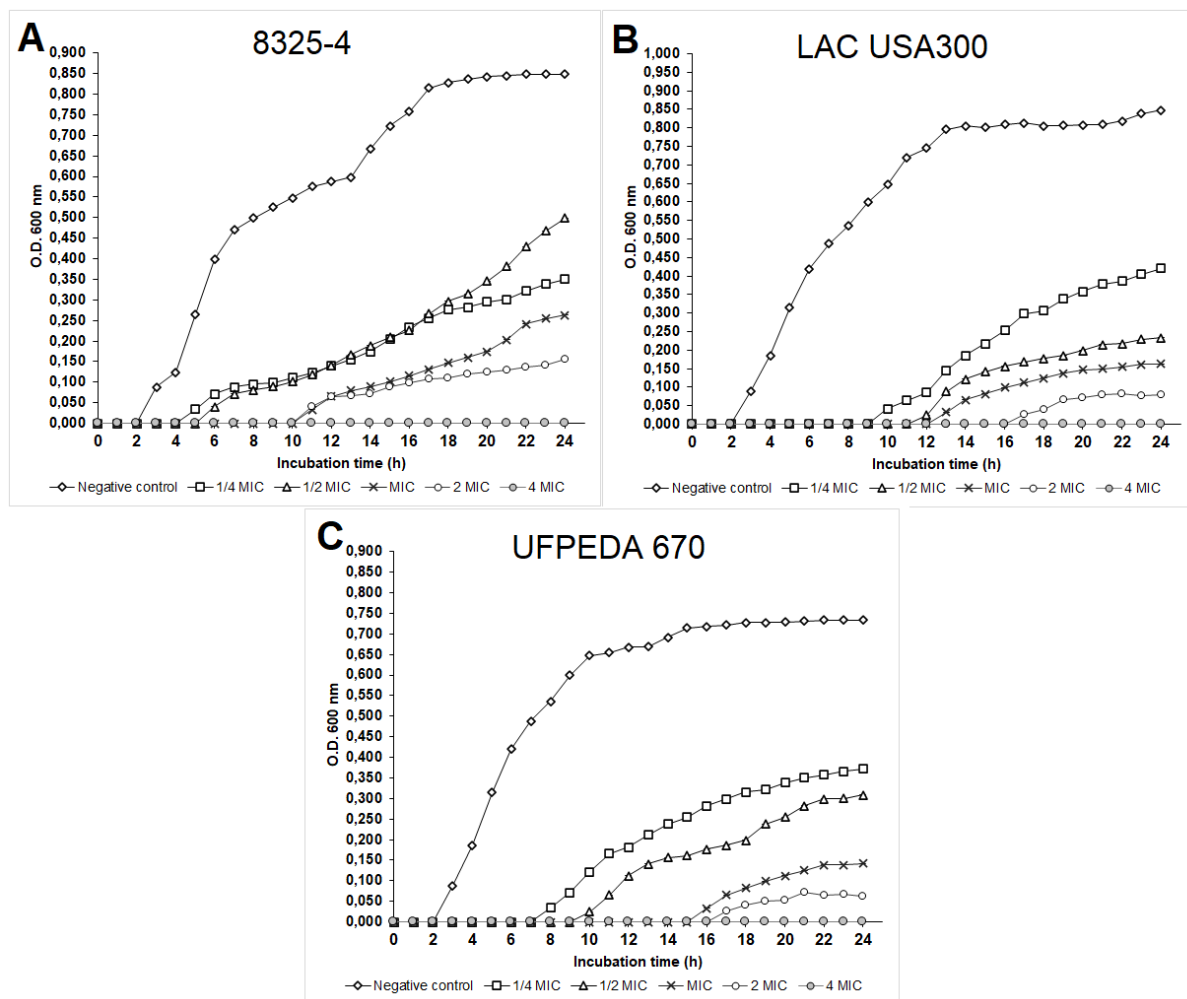


Figura 1. Curvas de crescimento (incubação de 24 h) de *Staphylococcus aureus* 8325-4 (A) e LAC USA300 (B) na ausência (controle negativo) e presença de PeRoL em diferentes concentrações. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experiências.

O aumento da resistência dos microrganismos aos mais diversos antibióticos faz com que novas fontes de antimicrobianos sejam buscadas. Porém, esta pesquisa também visa encontrar novos agentes antimicrobianos que, em combinação com os medicamentos existentes, tenham ação efetiva contra esses microrganismos. O uso de extratos de plantas ou compostos naturais puros em combinação com antibióticos convencionais pode ter sido considerado promissor por fornecer rapidamente opções de tratamento acessíveis (Da Silva et al., 2019a). Assim, a ação do PeRoL foi avaliada em combinação com antibióticos

convencionais. Os valores de MIC para os antibióticos usados no ensaio de sinergismo podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da atividade antibacteriana de PeRoL em combinação com os antibióticos cefoxitina (CFX) ou cefotaxima (CFT) contra isolados de *Staphylococcus aureus* 8325-4 (não resistente), LAC USA300 (MRSA) e UFPEDA 670 (resistente à oxacilina).

Isolados	PeRoL-CFX combinações				PeRoL-CFT combinações			
	MIC	em	ΣFIC	Efeito	MIC	em	ΣFIC	Efeito
	combinação (µg/mL)				combinação (µg/mL)			
	PeRoL	CFX			PeRoL	CFT		
8325-4	5.0	0.125	0.3125	Sinergismo	5.0	0.0625	0.3125	Sinergismo
LAC	0.625	0.002	0.12	Sinergismo	0.625	0.002	0.12	Sinergismo
USA300								
UFPEDA 670	2.5	0.0001	0.5	Sinergismo	0.002	0.8	0.03	Sinergismo

MIC: concentração inibitória mínima. ΣFIC: Soma das concentrações inibitórias fracionárias. CFX, cefoxitina. CFT, cefotaxima. Os valores de MIC para as lectinas e antibióticos sozinhos podem ser vistos na Tabela 1.

A ação sinérgica foi observada para a combinação de PeRoL e cefotaxima e a combinação de PeRoL e cefoxitina contra *S. aureus* isolado 8325-4, LAC USA300 e UFPEDA 670. O efeito sinérgico em LAC USA300 correspondeu a uma redução de 32.000 vezes do MIC para cefoxitina e cefotaxima; além disso, o efeito sinérgico no UFPEDA 670 correspondeu a uma redução de 320.000 vezes do MIC para a cefoxitina e 10 vezes do MIC para a cefotaxima. Esses resultados mostram o grande potencial sinérgico do PeRoL quando usado em combinação com cefoxitina e cefotaxima. Sinergismo de combinações lectina-antibiótico também foi detectada por Ferreira et al. (2017), avaliando os efeitos da lectina da inflorescência de *A. purpurata* em isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina (isolado UFPEDA-671), mostraram uma redução de 83 vezes da CIM de oxacilina. Silva et al. (2019), avaliando os efeitos da lectina de *Punica granatum* sarcotesta contra *Escherichia*

coli produtora de β -lactamase (isolado C-24716), exibiu uma redução de 22,727 vezes de Cefalexina MIC e 1.562,5 vezes de Ceftazidima CIM. Silva et al. (2019b). Mun et al. (2013), avaliando os efeitos da Curcumina, um flavonóide polifenólico natural, isolado do rizoma de *Curcuma longa* contra cepas de *S. aureus* (ATCC 33591), apresentou redução de 8 vezes da MIC de oxacilina e 4 vezes da MIC de ampicilina.

Na maioria das espécies bacterianas, como em *S. aureus*, a agregação e a formação de biofilme estão envolvidas na infecção e na patogênese (Hall-Standingley e Sgetherley, 2002; Kjelleberg e Molin, 2002; Crosby et al., 2016).

O efeito antiagregante do PeRoL foi avaliado e os resultados podem ser vistos na Figura 2, *S. aureus* 8325-4 tratado com MIC de PeRoL em comparação com o controle, apresentou aumento expressivo de OD₆₀₀, evidenciando maior presença de células isoladas na suspensão. O PeRoL a $\frac{1}{2}$ x MIC e MIC não promoveu efeitos de antiagregação nas cepas multirresistentes LAC USA300 e UFPEDA 670.

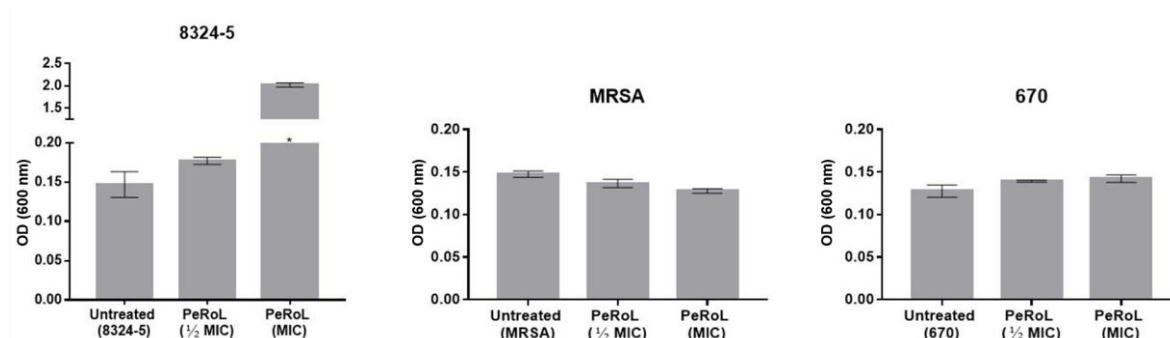


Figura 2. Avaliação dos efeitos do PeRoL na capacidade de agregação de isolados de *Staphylococcus aureus* 8325-4, LAC USA300 e UFPEDA 670. A quantificação da agregação foi realizada medindo a densidade óptica (OD) a 600 nm. Água Milli-Q foi usada no controle. As lectinas foram avaliadas em concentrações subinibitórias ($\frac{1}{2} \times$ MIC [concentração inibitória mínima]). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de três repetições.

A agregação bacteriana é um processo reversível observado nas células bacterianas e está diretamente relacionado com a adesão e colonização bacteriana.

A formação de agregados bacterianos tem se mostrado resultado de um mecanismo defensivo, como ser menos sensível a antibióticos (Ribas, 1997; Haaber et al., 2012).

S. aureus possui vários fatores de virulência entre eles, a propriedade hemolítica conferida por toxinas como alfa-hemolisina e beta-hemolisina codificadas pelo gene *hla* controlado pelo sistema *agr*. A produção de hemolisinas por *S. aureus* é dependente do seu estado de crescimento, as hemolisinas são responsáveis por promover a lise dos eritrócitos para obter nutrientes para sobreviver.

Para investigar se o PeRoL seria capaz de inibir a secreção de toxinas hemolíticas, as células LAC USA300 incubadas com ou sem a lectina foram avaliadas quanto à capacidade de lise em ágar sangue. Porém, os halos produzidos pelas células expostas ao PeRoL e pelas células controle apresentaram o mesmo diâmetro, indicando que não houve interferência ($p > 0,05$) na ação hemolítica. Os resultados de Silva et al. (2018) avaliando a capacidade da lectina de sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) são semelhantes ao PeRoL. No entanto, a quercetina extraída de *Alnus japonica*, ácido tânico, trans-resveratrol e vários flavonóides do vinho tinto foram capazes de inibir a hemólise por *S. aureus* (Lee et al., 2013; Cho et al., 2015).

S. aureus possui um sistema QS que regula e a expressão de fatores de virulência de bactérias gram-positivas (Castillo-Juárez et al., 2015). Esse sistema atua gerando dois transcritos primários, RNA II e RNA III, que são regulados pelos promotores P2 e P3, respectivamente. O RNA II contém os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. As proteínas AgrB e AgrD se unem para formar um peptídeo auto-indutor (AIP) e a proteína AgrC é um receptor transmembrana para AIP (Yarwood; Schlievert, 2003; Novick, 2003; Dehbashi et al., 2018). O AIP pode ativar P3, que

regula a transcrição da α -hemolisina encapsulada por hla e RNA III, responsável por ativar a expressão de várias proteínas de virulência, como delta-hemolisina, outras toxinas e enzimas e diminuir a expressão de proteínas de superfície como a proteína A codificada por spa, que é capaz de se ligar a imunoglobulinas e prejudicar a defesa do hospedeiro (Bennett et al., 2015; Dehbashi et al., 2018).

PeRoL não interferiu na expressão dos genes de virulência hla e mnaIII. Após o tratamento com a lectina, a expressão de spa (regulada negativamente pelo RNA III) não foi ativada. A incapacidade do PeRoL de modular a ação hemolítica de *S. aureus* pode ser confirmada com a ausência de alteração no gene hla. Em contraste com PeRoL, norlichexantona, um pequeno policetídeo tricíclico não reduzido produzido por fungos e líquens, reduz a expressão de hla que codifica α -hemolisina, bem como o RNAlII regulatório do sistema de detecção de quorum agr em *S. aureus* 8325-4 (Baldry et al., 2016).

4 Conclusão

PeRoL apresentou atividade antibacteriana contra isolados não resistentes e multirresistentes de *S. aureus*, incluindo uma cepa MRSA e uma resistente à oxacilina, afetando o crescimento das cepas e apresentando grande efeito sinérgico com os antibióticos comerciais aos quais os isolados apresentaram resistência. PeRoL apenas promove efeitos de antiagregação em cepas suscetíveis. Não foi capaz de inibir a secreção de toxinas hemolíticas e não interferiu na expressão dos genes de virulência.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 446902 / 2014-4) por bolsas de

pesquisa e bolsas LCBBC, THN e PMGP), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08 / 14; APQ-0661-2.08 / 15) para apoio financeiro. Os autores também agradecem a Carlos Eduardo Sales da Silva pela assistência técnica.

Referências

- BAIG, Sharmin *et al.* Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 74-76, 2018.
- BALDRY, Mara *et al.* Norlichexanthone reduces virulence gene expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 11, n. 12, 2016.
- BHUTIA, Sujit K. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological research**, 2019.
- BOLLENBACH, Tobias. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current opinion in microbiology**, v. 27, p. 1-9, 2015.
- CASTILLO-JUÁREZ, Israel *et al.* Role of quorum sensing in bacterial infections. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 3, n. 7, p. 575, 2015.
- CEPAS, Virginio *et al.* Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 1, p. 72-79, 2019.
- CHEESMAN, Matthew J. *et al.* Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 57, 2017.
- CHO, Hyun Seob *et al.* Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. **Biofouling**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2015.
- CROSBY, Heidi A.; KWIECINSKI, Jakub; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host–pathogen interactions. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 2016. p. 1-41.
- DA SILVA, Pollyanna Michelle *et al.* *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of

Staphylococcus aureus clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019.

DAI, Yingxin *et al.* Decreasing methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008–2017. **Emerging microbes & infections**, v. 8, n. 1, p. 471-478, 2019.

DEHBASHI, S. *et al.* The relationship between promoter-dependent quorum sensing induced genes and methicillin resistance in clinical strains of Staphylococcus aureus. **J Adv Med Biomed Res**, v. 26, n. 116, p. 75-87, 2018.

DELORME, Thierry *et al.* Genotypic and phenotypic variations in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from outpatient, inpatient and nursing homes. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 3, p. 316-325, 2019.

FEINMAN, Susan E. Antibiotics in animal feed--drug resistance revisited. **ASM News-American Society for Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 24-30, 1998.

FERREIRA, Gustavo Ramos Salles *et al.* Antimicrobial potential of Alpinia purpurata lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 152-162, 2018.

FERREIRA, RS1 *et al.* Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from Moringa oleifera. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 2, p. 186-192, 2011.

GABIUS, H.-J. *et al.* Sweet complementarity: the functional pairing of glycans with lectins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 73, n. 10, p. 1989-2016, 2016.

GOOTZ, Thomas D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 30, n. 1, 2010.

HAABER, Jakob *et al.* Planktonic aggregates of Staphylococcus aureus protect against common antibiotics. **PloS one**, v. 7, n. 7, 2012.

HALL-STOODLEY, Luanne; STOODLEY, Paul. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 228-233, 2002.

KJELLEBERG, Staffan; MOLIN, Soeren. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 3, p. 254-258, 2002.

KUMAR, K. Kiran *et al.* Biological role of lectins: A review. **Journal of orofacial sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

KUMAR, Sanath *et al.* Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 266, 2020.

LEE, Jin-Hyung *et al.* Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against Staphylococcus aureus. **Biofouling**, v. 29, n. 5, p. 491-499, 2013.

LI, Xian-Zhi; PLÉSIAT, Patrick; NIKAIIDO, Hiroshi. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LOOSE, Maria *et al.* Carbapenem-containing combination antibiotic therapy against carbapenem-resistant uropathogenic Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 1, 2019.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MIR, J.; MORATO, J.; RIBAS, F. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. **Journal of applied microbiology**, v. 82, n. 1, p. 7-18, 1997.

MUN, Su-Hyun *et al.* Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8-9, p. 714-718, 2013.

NASH, Anthony A.; DALZIEL, Robert G.; FITZGERALD, J. Ross. **Mims' pathogenesis of infectious disease**. Academic Press, 2015.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NIELSEN, Anita *et al.* Solonamide B inhibits quorum sensing and reduces *Staphylococcus aureus* mediated killing of human neutrophils. **PloS one**, v. 9, n. 1, 2014.

NOVICK, Richard P.; GEISINGER, Edward. Quorum sensing in staphylococci. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 541-564, 2008.

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

RAMOS, Dalila de Brito Marques *et al.* Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, 2014.

REIS, Ana Catarina M. *et al.* Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 647-650, 2014.

SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 73-81, 2009.

SILVA, José Dayvid Ferreira *et al.* *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019a.

SILVA, Romerio RS *et al.* Parkia platycephala lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of Haemonchus contortus. **Microbial pathogenesis**, v. 135, p. 103629, 2019b.

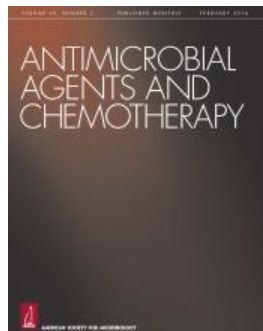
STARKEY, Melissa *et al.* Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 8, 2014.

TORRES, Michelly Élen Leal Menezes *et al.* DdeL, a novel thermostable lectin from Dypsis decaryi seeds: Biological properties. **Process Biochemistry**, v. 86, p. 169-176, 2019.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003.

3.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE RAIZ DE *PORTULACA ELATIOR* (PeRoL) CONTRA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTE À COLISTINA

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*”



Fator de Impacto: 4.615

Atividade antibacteriana da lectina de raiz de *Portulaca elatior* (PeRoL) contra *Klebsiella pneumoniae* resistente à colistina

José Dayvid Ferreira da Silva^a, Suellen Pedrosa da Silva^a, Wênio Sandoval Filho Lima da Silva^a, Pollyana Michele da Silva^a, Rodrigo Tenório Gomes Pereira^c, Wendell Palôma Maria dos Santos^c, Marcia Maria Camargo de Moraes^c, Roberto de Araújo Sá^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}.

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55604-000 Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil*

^c*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 50100-130, Recife, Pernambuco, Brazil.*

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

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

RESUMO

A raiz de *Portulaca elatior* contém uma lectina antimicrobiana chamada PeRoL. Neste trabalho, avaliamos a atividade antibacteriana do PeRoL contra uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente à colistina (Pol 18), uma vez que a colistina é usada atualmente como uma droga de última linha para infecções por bactérias Gram-negativas graves seguido por um aumento na resistência entre Bactérias Gram-negativas. A resistência à colistina é considerada um problema sério, devido à falta de antibióticos alternativos. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) e bactericidas (MBC) foram determinadas por diluição em caldo. Mudanças ultraestruturais foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. PeRoL mostrou atividade antibacteriana contra isolados de Pol 18 com valores de MIC e MBC de 16,0 µg / mL. PeRoL também adiou o início do crescimento em pelo menos dez horas na concentração de MIC. No MIC, a lectina não causou alterações no tamanho, formato e estrutura das células bacterianas, mas promoveu projeções fora das células tratadas. O efeito antibacteriano do PeRoL indica que esta molécula pode ter potencial para o tratamento futuro de infecções multidrogaresistentes. Este é o primeiro estudo relatando a atividade antibacteriana de um composto natural contra *K. pneumoniae* resistente à colistina.

Palavras-chave: Resistência microbiana, atividade antimicrobiana, colistina.

1 Introdução

A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema de saúde global, que compromete a eficácia dos antibióticos convencionais e é um importante mecanismo de sobrevivência que favorece os microrganismos no processo de infecção. Os principais mecanismos de resistência antimicrobiana são a diminuição da absorção de antibióticos (Pagès et al., 2008), modificação de alvos antibióticos (Sander et al., 2002) e inativação de antibióticos (Paterson et al., 2005). No entanto, novos mecanismos foram descobertos, incluindo efluxo de múltiplas drogas, integrons, hipermutabilidade e a transferência de plasmídeos, o último facilitou a disseminação da resistência entre as cepas (Livermore, 2003; Madigan et al., 2010; Li et al., 2015; Rehman et al., 2019).

Enterobacteriaceae tem a capacidade de sintetizar enzimas capazes de degradar uma variedade de antibióticos. As principais enzimas produzidas são beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), metalobetalactamases (MBL) e beta-lactamases de classe C (AmpC). As cepas produtoras dessas enzimas se espalharam mundialmente e são responsáveis por elevar os custos do tratamento, além de aumentar as taxas de morbimortalidade (Hawkey e Jones, 2009; Meyer e Picoli, 2011; Arena et al., 2020).

Klebsiella pneumoniae possui diversos fatores de virulência envolvendo cápsulas, lipopolissacarídeos (LPS), fimbrias, adesinas não fimbriais e sistemas de eliminação de ferro (sideróforos) (Paczosa e Mecsas, 2016). Além disso, a patogenicidade da *Klebsiella* é aumentada por sua capacidade de formação de biofilme (Desai et al., 2019).

O aumento global do número de casos envolvendo *K. pneumoniae* com resistência múltipla a cefalosporinas, monobactâmicos, beta-lactâmicos e

carbapenêmicos tem feito com que a colistina (polimixina E) seja reintroduzida no tratamento de infecções por esse microrganismo. No entanto, casos de cepas resistentes à colistina também foram relatados (Olaitan et al., 2014; Liu et al., 2015; Macesic, 2019). A colistina tem sido a última opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC (KPC-Kp), a mais prevalente entre as enterobacteriaceae resistentes a carbobenem no mundo (Paczosa e Meccas, 2016). Além disso, as opções de tratamento para cepas resistentes estão ficando menores, a necessidade de usar novas abordagens antimicrobianas é destacada (Olaitan et al., 2014; Nation et al., 2015).

Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados com alta especificidade. A raiz de *Portulaca elatior* (PeRoL) é uma proteína de ligação à trealose, com 32 kDa que apresenta atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas e fúngicas (Silva et al., 2019).

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana do PeRoL contra um isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente à colistina por meio da determinação de curvas de crescimento. A ultraestrutura das bactérias também foi avaliada. Este é o primeiro estudo usando um composto natural contra *K. pneumoniae* resistente à colistina.

2 Materiais e métodos

2.1 Isolamento da lectina

Portulaca elatior foi coletada em Aroeiras (Paraíba, Brasil) sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (licença número 36301). PeRoL foi isolado de acordo com Silva et al. (2019): a raiz foi passada por uma peneira (malha de 1 mm), misturada com NaCl 0,15 M (na proporção de 1:10, v / v) e homogeneizada durante 6 h sob

agitação magnética. O extrato foi obtido por filtração e centrifugação (9000 g, 15 min, 4 °C). O extrato foi aplicado (8,0 mg de proteína) em uma coluna de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com 0,15 M de NaCl. PeRoL foi recuperado por eluição com ácido acético 1,0 M e dialisado contra água destilada (6 h) para eliminar o eluente.

2.2 Concentração de proteína e ensaio de hemaglutinação

A concentração de proteínas foi estimada de acordo com Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão (31,25 a 500 µg / mL) de albumina de soro bovino. A atividade hemaglutinante (HÁ) foi investigada utilizando uma suspensão previamente tratada com glutaraldeído de eritrócitos de coelho (2,5% v / v) (Bing et al., 1967). foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada a 27 °C durante 45 min. No controle, a suspensão de eritrócitos foi incubada com NaCl 0,15 M. O HA foi expresso como o recíproco da maior diluição de amostra capaz de promover aglutinação. O HA específico foi calculado pela razão entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteína (mg / mL).

2.3 Isolado bacteriano

O isolado clínico de *K. pneumoniae* (Pol 18), resistente a antimicrobianos convencionais como β-lactâmicos e carbapenêmicos, foi obtido no Laboratório de Resistência Microbiana da Universidade de Pernambuco / Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil). As culturas de estoque foram mantidas a -80 °C em Caldo Mueller Hinton (MHB) estéril com 10% (v/v) de glicerol. Para uso nos ensaios, as bactérias foram cultivadas em Agar Mueller Hinton (MHA) durante a noite a 37 °C

e depois cultivadas em MHB a 37 °C sob agitação a 200 rpm. A densidade da cultura foi ajustada turbidimetricamente a 600 nm (OD600) para 1×10^8 unidades formadoras de colônias (CFU) por mL (0,5 na escala de McFarland) em NaCl 0,15 M estéril.

2.4 *Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) e bactericidas mínimas (MBC)*

Os valores de MIC foram determinados para PeRoL e drogas comerciais em uma linha de uma microplaca de fundo plano de 96 poços, 100 µL de caldo Mueller Hinton (MHB) foram adicionados a todos os poços, exceto o primeiro (controle de esterilidade), que foi preenchido com 200 µL deste meio de cultura. Em seguida, 100 µL de PeRoL (0,5 mg / mL) foram adicionados ao terceiro poço e uma diluição em série de duas vezes foi realizada até o final da linha. Finalmente, a suspensão bacteriana (100 µL; 3×10^6 CFU / mL) foi adicionada do segundo ao décimo segundo poço. O segundo poço (contendo o microrganismo na ausência da lectina) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. O OD600 foi medido usando um leitor de microplaca no tempo zero e após 24 h a 37 °C. A MIC foi definida como a menor concentração de lectina / antibiótico capaz de promover redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação com o controle de crescimento de 100%. Para determinar o MBC, alíquotas (10 µL) dos poços contendo concentrações de lectina $\geq$ MIC foram inoculadas em placas de petri contendo MHA, que foram então incubadas por 24 h a 37 °C. O MBC correspondeu à menor concentração de lectinas capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi conduzido em triplicado e três experimentos independentes foram realizados.

2.5 *Curva de crescimento*

Curvas de crescimento de 24 horas de Pol 18 na ausência ou presença de PeRoL foram estabelecidas. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços conforme descrito na seção 2.4: o primeiro poço correspondia ao controle de esterilidade; o segundo poço correspondeu ao controle de 100% de crescimento; o terceiro ao sexto poços correspondiam a tratamentos com PeRoL a 4 ×MIC, 2 ×MIC, MIC, 1/2 ×MIC e 1/4 ×MIC. A microplaca foi incubada a 37 °C e a OD600 determinada a cada hora. Três experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 *Analises microscópicas*

Imagens tridimensionais da estrutura das células bacterianas tratadas com ou sem PeRoL foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células (1,2 mL; 10⁶ CFU / mL) foram incubadas com MHB ou SDB (0,6 mL) e PeRoL (0,4 mL) no respectivo MIC ou 2 ×MIC em água Milli-Q. O controle negativo foi estabelecido pela adição de água Milli-Q em vez de lectina. Após a incubação (24 h a 37 °C), as amostras foram centrifugadas (300 × g; 10 min, 25 °C) e as células precipitadas foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M e fixadas em glutaraldeído 2,5% em cacodilato 0,1 M tampão pH 7,2 por 30 min a 28 °C. Após lavagem com o mesmo tampão, as células foram deixadas aderir aos tocos (Ø 12,7 mm, 9 mm de comprimento; Ted Pella Inc., Redding, CA, EUA) e pós-fixadas por 1 h com tetróxido de ósmio 1%. As células foram desidratadas em acetona graduada, secas no ponto crítico com CO₂, revestidas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura e observadas com um microscópio JEOL JSM-5600 LV (JEOL, Peabody, MA, EUA). As células sem tratamento foram utilizadas como controle.

2.7 **Análise estatística**

Os dados são expressos como a média ou a média percentual $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste de intervalo de Tukey; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 **Resultados e discussão**

PeRoL apresentou atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae* (Pol 18) e a tabela 1 mostra que a lectina na mesma concentração (16,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$) foi um agente bacteriostático e bactericida. Até onde sabemos, PeRoL é o primeiro composto de origem natural com atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae* resistente à colistina. Dentre os compostos testados, PeRoL foi o mais eficiente, pois sua MIC foi encontrada em concentração menor que a dos antibióticos e a redução da viabilidade celular só foi detectada após tratamento com lectina (Tabela 1).

As lectinas podem promover a inibição do crescimento ou morte do microrganismo devido à sua capacidade de reconhecer especificamente os glicanos da parede celular microbiana. A interação lectina-bactéria pode causar formação de poros na parede celular, morte por extravasamento do conteúdo celular, absorção de nutrientes, indução de estresse oxidativo e alteração da permeabilidade da membrana (Paiva et al., 2010; Carvalho et al., 2015; Procópio et al., 2017).

Tabela 1. Atividade antibacteriana de PeRoL e drogas comerciais contra *Klebsiella pneumoniae* isolado Pol 18 (resistente a colistina).

Compostos	Pol 18	
	MIC	MBC
PeRoL	16.0	16.0
Ampicillin	>32.0	ND
Ampicillin/Sulbactam	>32.0	ND
Cefuroxime	>64.0	ND
Cefoxitin	>64.0	ND
Ceftazidime	>64.0	ND
Ceftriaxone	>64.0	ND
Cefepime	>64.0	ND
Imipenem	>16.0	ND
Meropenem	>16.0	ND
Polimixin B (Colistin)	>16.0	ND

MIC and MBC: concentrações inibitórias e bactericidas mínimas, respectivamente, expressas em µg / mL. ND: não detectado.

A fim de monitorar a cinética de eliminação de tempo, as curvas de crescimento de Pol 18 incubado com PeRoL em diferentes concentrações foram estabelecidas (Figura 1). O crescimento da Pol 18 foi inibido a partir da quarta hora de incubação em todos os tratamentos com PeRoL, denotando forte efeito bacteriostático. O crescimento na presença de PeRoL começou apenas na quarta hora com $1/4 \times \text{MIC}$, na sexta hora com $1/2 \times \text{MIC}$ e na décima segunda hora com MIC e com $2 \times \text{MIC}$. Em $4 \times \text{MIC}$, nenhum crescimento foi detectado para a cepa ao longo do ensaio. Os resultados revelam que o PeRoL não apenas reduz a contagem bacteriana, mas também adia o início da replicação celular.

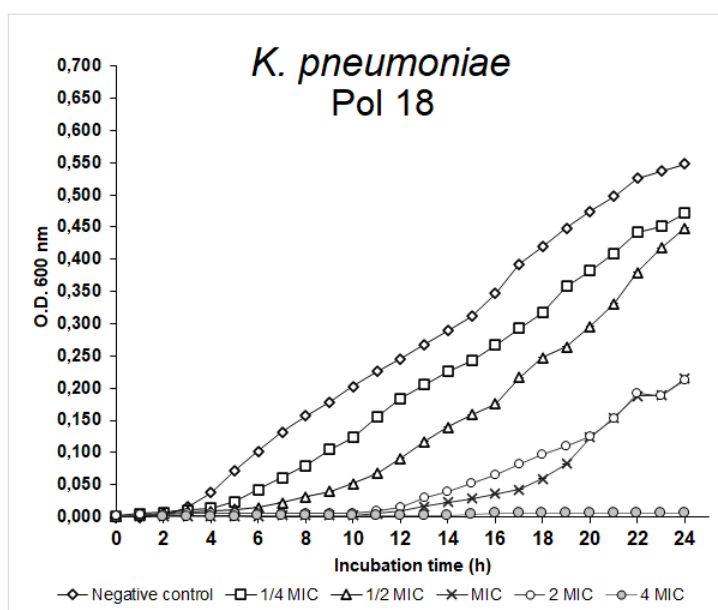


Figura 1. Curvas de crescimento (incubação de 24 h) de *Klebsiella pneumoniae* Pol 18 na ausência (controle negativo) e presença de PeRoL em diferentes concentrações. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experiências.

Os efeitos do PeRoL na estrutura bacteriana foram avaliados através de imagens tridimensionais de células tratadas com PeRoL no MIC (Fig. 2). As células de controle mostraram uma forma preservada (bactéria em forma de bastonete), tamanho regular e superfície lisa. Nos tratamentos com a lectina, não foram observadas alterações morfométricas na estrutura bacteriana. Por outro lado, podem ser observadas projeções fora das células tratadas.

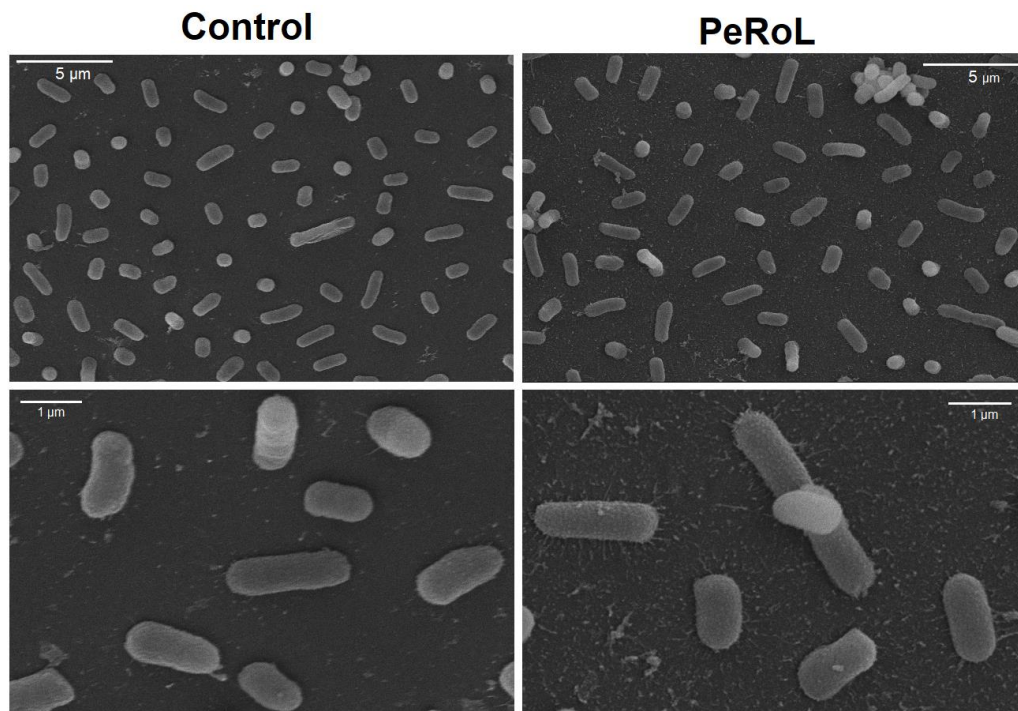


Figura 2. Curvas de crescimento (incubação de 24 h) de *Klebsiella pneumoniae* Pol 18 na ausência (controle negativo) e presença de PeRoL em diferentes concentrações.

4 Conclusão

PeRoL mostrou atividade antibacteriana contra um isolado multirresistente de *K. pneumoniae*, afetando o crescimento das cepas. Este é o primeiro composto natural relatado como tendo atividade contra um *K. pneumoniae* resistente à colistina.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 446902 / 2014-4) por bolsas de pesquisa e bolsas THN e PMGP), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08 / 14; APQ-0661-2.08 / 15) para apoio financeiro. Os autores também agradecem a Carlos Eduardo Sales da Silva pela assistência técnica.

References

- ARENA, Fabio et al. Population structure of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute-care rehabilitation facility: identification of a new lineage of clonal group 101, associated with local hyperendemicity. **Microbial Genomics**, p. mgen000308, 2020.
- CARVALHO, Aline *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.
- CORIOLOANO, M. C. *et al.* Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, 2019.
- DA SILVA, Pollyanna Michelle *et al.* *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019.
- DESAI, Siddhi; SANGHRAJKA, Kinjal; GAJJAR, Devarshi. High Adhesion and Increased Cell Death Contribute to Strong Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 277, 2019.
- HAWKEY, Peter M.; JONES, Annie M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. suppl_1, p. i3-i10, 2009.
- LI, Xian-Zhi; PLÉSIAT, Patrick; NIKAIDO, Hiroshi. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.
- LIU, Yi-Yun *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.
- LIVERMORE, David M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical infectious diseases**, v. 36, n. Supplement_1, p. S11-S23, 2003.
- MACESIC, Nenad *et al.* Emergence of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* through diverse genetic adaptations: A genomic, retrospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, 2019.
- MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.
- MEYER, Gabriela; PICOLI, Simone Ulrich. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 24-31, 2011.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PAGÈS, Jean-Marie; JAMES, Chloë E.; WINTERHALTER, Mathias. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 893-903, 2008.

PANSUKSAN, Kanoktip; SUKPRASERT, Sophida; KARAKET, Netiya. Phytochemical Compounds in *Arundo donax* L. Rhizome and Antimicrobial Activities. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 2, 2020.

PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

QADIR, Sakeena *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n. 11, p. 999, 2013.

REHMAN, Attika; PATRICK, Wayne M.; LAMONT, Iain L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 1-10, 2019.

SANDER, P. *et al.* Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. **Molecular microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1295-1304, 2002.

SILVA, José Dayvid Ferreira *et al.* *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.

3.4 *PORTULACA ELATIOR* ROOT LECTIN (PeRoL): RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS FÚNGICOS E EFEITOS NO CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* E *CANDIDA KRUSEI*.

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “*International Journal of Biological Macromolecules*”



Fator de Impacto: 4.784

***Portulaca elatior* root lectin (PeRoL): reconhecimento de carboidratos fúngicos e efeitos no crescimento e formação de biofilme de *Candida albicans* e *Candida krusei*.**

José Dayvid Ferreira da Silva^a, Suellén Pedrosa da Silva^a, Pollyana Michelle da Silva^a, Lisete Silva^c, Yan Liu^c, Roberto Araújo Sá^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Ten Feizi^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55604-000 Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.*

^c*Faculty of Medicine, Department of Metabolism, Digestion and Reproduction, Imperial College London, London, United Kingdom.*

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

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

RESUMO

A raiz de *Portulaca elatior* contém uma lectina ligante de quitina (PeRoL) com atividade antimicrobiana contra espécies patogênicas humanas, incluindo *Candida albicans* e *Candida krusei* (concentrações mínimas inibitória e fungicida de 16 µg/mL). No presente trabalho, nós investigamos os efeitos de PeRoL na cinética de crescimento e na formação de biofilme por *C. albicans* e *C. krusei*. Adicionalmente, nós avaliamos a interação de PeRoL com diferentes glicanos, incluindo aqueles presentes em paredes celulares fúngicas. PeRoL inibiu o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* nas primeiras horas em concentrações iguais ou maiores que 16 µg/mL (CMI) e reduziu a formação de biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* nas concentrações de 32 e 64 µg/mL. PeRoL ligou vários glicanos inclusive aqueles que contêm resíduos de quitina e manose e glicanos com ligações β 1-3, presentes na membrana de fungos do gênero *Candida*. Em conclusão, PeRoL é um agente anti-*Candida* que interfere no crescimento fúngico ao se ligar a glicanos presentes na parede celular e inibe o desenvolvimento do biofilme.

Palavras-chave: Biofilme, Lectina, Ligantes de glicanos, Portulaca

1 Introdução

As infecções fúngicas têm crescido em todo o mundo, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Leroy et al., 2016; Moota et al., 2017; Enoch et al., 2017). A candidíase invasiva e a candidemia representam um sério problema de saúde pública associado a altas taxas de mortalidade, tempo prolongado de internação e altos custos (Doi et al., 2016; Strollo et al., 2017). Espécies do gênero *Candida* são encontradas como constituintes saprófitas da microbiota humana normal, mas elas podem se tornar patógenos oportunistas (Papon et al., 2013).

Candida albicans é considerada o agente causador mais comum de doenças fúngicas dentro do gênero *Candida* em seres humanos, sendo normalmente responsável por 90-100% das infecções da mucosa e 50-70% dos episódios de candidemia (Naglik et al., 2019). *Candida krusei* tornou-se um patógeno emergente, responsável por cerca de 1,5 a 8% dos casos de candidemia, além deste microrganismo apresentar resistência intrínseca ao fluconazol e suscetibilidade reduzida a outros azóis e polienos (Doi et al., 2016; Hrabovský et al., 2017). Muito embora *C. albicans* e *C. krusei* possam existir de forma planctônica, elas habitam os seres humanos predominantemente como biofilmes, que são comunidades fúngicas ligadas a uma superfície sólida, incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (Tsui et al., 2016). Devido à maior resistência dos biofilmes aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro em comparação às culturas planctônicas, a formação de biofilme é um importante atributo de virulência destes microrganismos (Gulati et al., 2016).

A toxicidade e a eficácia variável dos antifúngicos disponíveis para o tratamento da candidíase demonstram a necessidade urgente para a descoberta de novos agentes antifúngicos (Laniado-Laborín et al., 2009; Roemer et al., 2014;

Pappas et al., 2016). As lectinas são proteínas que podem desencadear respostas celulares após interagirem com membranas através de suas porções de carboidratos (Sultana et al., 2019; Hiremath et al., 2020). Silva et al. (2019) reportaram que a lectina isolada da raiz de *Portulaca elatior* Mart. ex Rohrb (denominada PeRoL), não é citotóxica frente a células mononucleares do sangue periférico e eritrócitos e é um agente fungistático e fungicida contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, e *Candida tropicalis* com concentrações mínimas inibitória e fungicida de 16 µg/mL para todos os microrganismos testados.

Neste trabalho, nós avaliamos os efeitos de PeRoL na cinética de crescimento e a produção de biofilme por *C. albicans* e *C. krusei*, bem como a interação da lectina com glicanos estruturalmente diversos, incluindo alguns presentes em paredes fúngicas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Isolamento da Lectina

Espécimes de *P. elatior* foram coletados na cidade de Aroeiras, Estado da Paraíba, nordeste do Brasil, com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (número 38690) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. Um espécime de voucher foi arquivado no herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brasil, sob o número de registro 90796.

PeRoL foi isolada da raiz como descrito por Silva et al. (2019). A raiz foi seca a 60 °C por 5 dias e depois triturada com um triturador. O pó da raiz foi homogeneizado com NaCl 0,15 M, na proporção de 1:10 (p/v), utilizando agitador magnético durante 6 h a 28°C. O extrato obtido após filtração da mistura em papel

de filtro e centrifugação do filtrado (9.000 g; 15 min, 4°C) foi aplicado (2 mL, 10,26 mg de proteína) em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) previamente equilibrada (20 mL/h) com NaCl 0,15 M. A coluna foi lavada com NaCl 0,15 M até que a absorbância a 280 nm fosse inferior a 0,03. PeRoL foi eluída (frações com absorbância superior a 0,100) da coluna com ácido acético 1,0 M e em seguida foi dialisada contra NaCl 0,15 M (4 h) para eliminação do eluente.

2.2 Dosagem de proteínas e atividade hemaglutinante

A concentração de proteínas foi estimada de acordo com Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão (31,25 a 500 µg/mL) de albumina de soro bovino. A atividade hemaglutinante (AH) foi investigada de acordo com Paiva e Coelho (1992) em microplacas de 96 poços com fundo em “V”. A amostra (50 µL) foi diluída em série em 50 µL NaCl 0,15 M e, em seguida, 50 µL de uma suspensão (2,5% v / v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (Bing et al., 1967) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada a 27 °C por 45 min. No controle, a suspensão de eritrócitos foi incubada com NaCl 0,15 M. A AH foi expressa como o recíproco da maior diluição da amostra capaz de promover aglutinação. A AH específica foi calculada pela razão entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteína (mg/mL).

2.3 Isolados fúngicos

Os isolados *Candida albicans* (URM 5901) e *Candida krusei* (URM 6391) foram obtidas na coleção de culturas da Universidade Recife micologia (URM), Departamento de micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os fungos foram cultivados em caldo Sabouraud Dextrose pH 5,6, a 28 °C, sob agitação suave. Para uso nos ensaios, a densidade das culturas foi ajustada

turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (OD_{600}) a 1×10^6 ou 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

2.4 Verificação das atividades fungistática e fungicida de PeRoL

Para verificar a atividade antifúngica da amostra de PeRoL utilizada nesse estudo, os valores de concentração mínima inibitória (CMI) e fungicida (CMF) foram determinados de acordo com o método descrito por Silva et al. (2019). A CMI foi definida como a menor concentração de lectina capaz de promover uma redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação com o controle de crescimento de 100%. A CMF correspondeu à menor concentração de PeRoL capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e foram realizados três experimentos independentes.

2.5 Curvas de Crescimento

Foram estabelecidas curvas de crescimento durante 24 h de *C. albicans* e *C. krusei* na ausência ou presença de PeRoL em diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em uma fileira de uma microplaca de 96 poços, os quais receberam água Milli-Q (80 μ L) estéril. Em seguida a lectina (80 μ L) foi adicionada ao terceiro poço e uma diluição em série foi realizada para se obter as concentrações correspondentes a $4 \times \text{MIC}$, $2 \times \text{MIC}$, MIC , $1/2 \times \text{MIC}$ e $1/4 \times \text{MIC}$. Em seguida, 40 μ L de caldo Sabouraud Dextrose foi adicionado a todos os poços da fileira. Finalmente, o inóculo fúngico (80 μ L, 10^6 UFC/mL) foi adicionado, exceto ao primeiro poço, que funcionou como controle de esterilidade. O segundo poço (contendo o microrganismo na ausência da lectina) correspondeu ao controle de crescimento. A microplaca foi incubada a 28 °C e a densidade óptica (DO_{600}) foi determinada a cada hora, por 24 h. O ensaio foi realizado em triplicata e foram realizados três experimentos independentes.

2.6 Atividade antibiofilme

O inóculo fúngico (80 μ L, 10^8 UFC/mL) foi incubado com água Milli-Q estéril (80 μ L) e caldo Sabouraud Dextrose (40 μ L) por 24 h a 37 °C sem agitação em uma placa de microtitulação de 96 poços. Após esse período, o conteúdo do poço (células planctônicas) foi removido e o biofilme formado foi tratado com 80 μ L de água Milli-Q estéril (controle negativo) ou PeRoL (8, 16, 32 e 64 μ g/mL). As placas foram incubadas novamente por 24 h a 37 °C e, após esse período, os poços foram lavados três vezes com 200 μ L de solução salina estéril. Os biofilmes restantes foram fixados a 60 °C por 60 min e corados com 0,4% (p/v) de cristal violeta por 15 min a 25 °C. Os poços foram lavados com 200 μ L de água destilada e o corante que se ligou ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto (200 μ L) e a absorbância foi medida a 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7 Análises de microarray de glicanos

PeRoL foi previamente biotinilada usando 2 mg de *EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin* (Thermo Fisher Scientific, EUA) conforme protocolo do fabricante. Os *microarrays* foram compostos de oligossacarídeos ligados a lipídios (neoglicolipídeos – NGL's), impressos roboticamente em duplicata em lâminas de vidro revestidas com nitrocelulose a 2 e 7 fmol por *probe* usando um instrumento sem contato, como descrito anteriormente (Palma et al., 2006). Os ensaios de ligação em *microarray* de PeRoL foram realizados entre 19 e 20 °C, conforme descrito por Liu et al. (2012).

Em resumo, as lâminas foram bloqueadas com albumina sérica bovina a 1% p/v (Sigma-Aldrich, EUA) em solução bloqueadora de caseína (Pierce Chemical Co, EUA) por 1 h. PeRoL biotinilada foi sobreposta nas lâminas a uma concentração de 50 μ g/mL, e a ligação entre PeRoL e os glicanos foi detectada utilizando

estreptavidina marcada com Alexa Fluor 647 (Molecular Probes-Life Technologies, CA, EUA) a 1 µg/mL em solução bloqueadora. Os dados dos array de glicanos foram avaliados utilizando software para microarrays de glicanos (Stoll et al., 2009).

2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ou a porcentagem média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Tukey; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 Resultados e Discussão

Antifúngicos comerciais vêm perdendo eficiência devido ao surgimento de cepas resistentes (Dominguez et al., 2019; Berman et al., 2020). A investigação de compostos naturais quanto a atividade antifúngica pode disponibilizar protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (Pfaller et al., 2013; Nicola et al., 2019) e consequentemente é uma estratégia interessante do ponto de vista de ampliação de alternativas terapêuticas.

PeRoL é uma lectina antimicrobiana com atividade bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (CMI de 8,12, 4,06 e 32,5 µg/mL, respectivamente) e antifúngica para espécies de *Candida* com CMI e CMF de 16,0 µg/mL (Silva et al., 2019). Neste trabalho nós ampliamos a avaliação dos efeitos de PeRoL contra *C. albicans* e *C. krusei* através do acompanhamento por 24 h do crescimento fúngico e determinação da capacidade de produção de biofilme pelos isolados na presença dessa lectina. Adicionalmente, utilizamos *microarray* de glicanos para investigar a afinidade de PeRoL a glicanos, incluindo alguns presentes em superfícies fúngicas.

PeRoL (0,5 mg) foi isolada seguindo o protocolo estabelecido por Silva et al (2019) com atividade hemaglutinante específica de 120,22. A ação antifúngica foi igual àquela determinada anteriormente, sendo novamente detectados valores de CMI e CMF de 16 µg/mL. A atividade antifúngica de lectinas pode estar associada a estresse oxidativo e dano a parede celular (Del Rio et al., 2018). Lectinas de plantas que interferem no crescimento e sobrevivência de *C. albicans* já foram isoladas de folhas de *Schinus terebinthifolius* (CMI e CMF de 6,5 e 26,0 µg/mL, respectivamente), de sementes de *Dypsis decaryi* (CMI de 2,06 µg/mL) e de sementes de *Dioclea violacea* com CMI de 32 µg/mL (Gomes et al., 2013; Torres et al., 2019).

A cinética da inibição do crescimento fúngico foi monitorada por 24 h com PeRoL nas concentrações equivalentes a $4 \times$ CMI, $2 \times$ CMI, CMI, $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI (Figura 1). O crescimento de *C. albicans* (Figura 1A) foi significativamente ($p < 0,05$) inibido desde a primeira hora de incubação em tratamentos com PeRoL em concentrações $\geq$ CMI. Na presença da lectina a $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI, o crescimento desta espécie foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que no controle a partir da quarta hora. Para *C. krusei* (Figura 1B) a inibição do crescimento também ocorreu desde a primeira hora de incubação PeRoL em concentrações $\geq$ CMI. Esses resultados revelam que PeRoL exerceu efeito fungicida contra *C. albicans* e *C. krusei* em poucas horas de incubação, similarmente ao relatado por Da Silva et al. (2018) para a lectina isolada da sarcotesta de *Punica granatum*. Por outro lado, Ferreira et al. (2018) reportaram que a lectina extraída de *Alpinia purpurata* inibiu o crescimento de *C. albicans* após a décima-oitava hora.

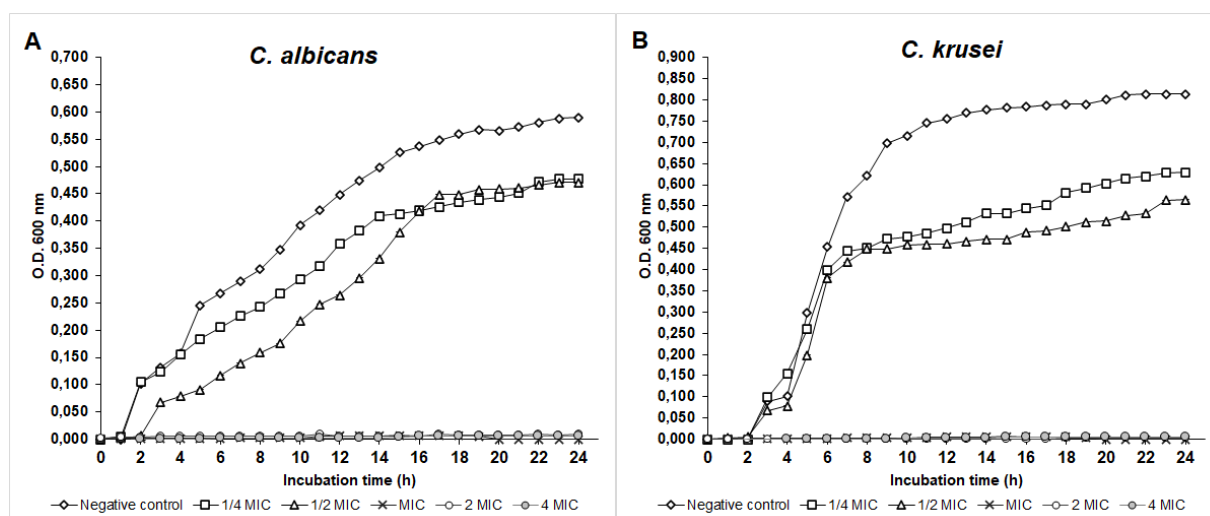


Fig 1. Efeitos do PeRoL no crescimento de *Candida albicans* e *Candida krusei*. Curvas de crescimento na ausência ou presença de PeRoL em diferentes concentrações. A densidade óptica (O.D.) a 600 nm foi determinada a cada hora durante 24 h. As células de controle negativo foram cultivadas em um meio livre de lectina. MIC: concentração inibitória mínima.

A espécies do gênero *Candida* formam comunidades estruturadas circundadas por matriz polimérica em superfícies bióticas e abióticas (Zhang et al., 2019). Estes biofilmes representam um sério desafio de tratamento na clínica, uma vez que são tipicamente resistentes a todas as classes de drogas antifúngicas usadas no tratamento de infecções planctônicas (Fox et al., 2015). PeRoL nas concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ (4 x CMI) e de 32 $\mu\text{g/mL}$ (2 x CMI) inibiu o desenvolvimento de biofilme por *C. albicans* e *C. krusei* (Fig. 2). Estes resultados podem ser devido a presença de um agente antifúngico (PeRoL), uma vez que a formação do biofilme é um mecanismo de proteção. Isso também foi observado para a anfotericina B (KVASNICKOVA, 2015) e para PgTeL (DA SILVA, 2018), que são agentes antifúngicos que promovem a formação do biofilme de *C. parapsilosis* e de *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente

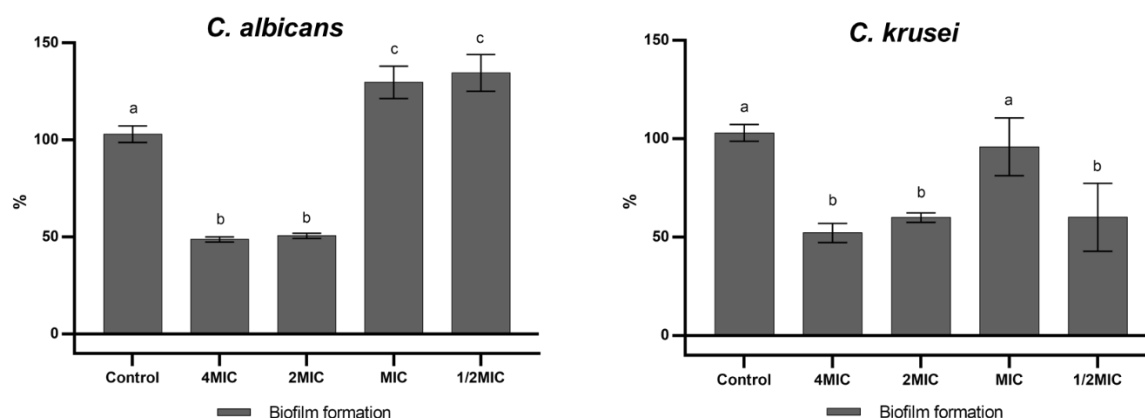


Fig 2. Formação de biofilme *C. albicans* e *C. krusei* na ausência (controle) e presença de PeRoL em diferentes concentrações. O crescimento foi avaliado por densidade óptica a 600 nm (OD_{600}). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. MIC50: concentração inibitória mínima.

Atividade antibiofilme de compostos de origem vegetal já foi reportada contra *C. albicans*. O óleo essencial de *Laurus nobilis* foi uma agente antibiofilme menos eficiente que PeRoL desde inibiu a formação do biofilme de *C. albicans* na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ enquanto o terpenóide eucarobustol E de *Eucalyptus robusta*, apresentou efeito similar a PeRoL inibindo na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ (Peixoto et al., 2017; Ourabah et al., 2019). Silva et al. (2018) reportou que a lectina de *Punica granatum* foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* nas concentrações de 0,195 a 0,9 $\mu\text{g/mL}$.

Estudos têm demonstrado que lectinas que ligam quitina são antifúngicas por interagirem com componentes da parede celular do fungo (Coelho et al., 2017). Em fungos, essa parede é composta principalmente por glicanos formados por ligações $\beta 1-3$ e $\beta 1-6$, quitina e proteínas fortemente manosiladas (Poulain et al., 2015; Hofs et al., 2016; Bongomin et al., 2017). Neste trabalho as propriedades de ligação a carboidratos de PeRoL foram determinadas através de análises de *microarrays* de glicanos.

PeRoL se ligou a monossacarídeos, glicanos sulfatados, glicanos com resíduos siálicos, resíduos de quitina e glicanos do grupo sanguíneo O e A. A

intensidade relativa de ligação a 27 probes é mostrada na figura 3 e é comparada com a ligação mais forte para PeRoL (100%) (em vermelho na figura 3). Não foram detectadas ou foram detectadas ligações fracas entre PeRoL e os outros probes testados. A interação de PeRoL com quitina tinha sido anteriormente detectada por Silva et al. (2019) através da adsorção da lectina a coluna de quitina e o dado do ensaio de *microarrays* de glicanos confirmou esta característica. A ligação de PeRoL as *probes* de quitosana (GlcN4-AO, GlcN5-AO, GlcN6-AO) não foi detectada e isto corrobora com Silva et al. (2019) que não detectaram afinidade de PeRoL por quitosana no ensaio de inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos. A atividade hemaglutinante de lectina é devida a ligação a carboidratos da superfície de eritrócitos e carboidratos que são reconhecidos pelos sítios de ligação da lectina, inibem a atividade hemaglutinante (Coelho et al., 2018).

A ligação de PeRoL a glicanos com ligação β 1-3 (o glicano neutro iLNO-AD e o glicano fucosilado TFiLNO), manose (6P-Man e 6P-Man-AO), glicanos contendo manose (galactomananas; Gal-Mannan DP2-AO e Gal-Mannan DP6b-AO) e resíduos de quitina, que são encontrados em paredes celulares fúngicas, sugere que o mecanismo de ação de PeRoL inclui ligação a parede celular. Ainda, compostos que tem como alvos componentes da parede celular do fungo interferem na síntese da enzima β -1,3-glicano sintase e promovem alteração da membrana, causando desordem e morte celular (Hector, 1993; Abruzzo et al., 2000).

Position	Probe	Structure	PeRoL
15	GSC-187	NeuA α -3Gal β -C29	
245	SA(3')-LNFP-III	NeuA α -3Gal β -4GlcNAc β -3Gal β -4Glc-DH Fuc α -3	
281	H2 (with H2+Fuc)*	Fuc α -2Gal β -4GlcNAc β -3Gal β -4GlcNAc β -3Gal β -4Glc β -Cer	
282	Ab (with Ab+Fuc)*	GaNAc α -3Gal β -4GlcNAc β -3Gal β -4GlcNAc β -3Gal β -4Glc β -Cer Fuc α -2	
288	iLNO-AD	GaB β -3GlcNAc β -3Gal β -4GlcNAc β -6 GaB β -4Glc-AD GaB β -3GlcNAc β -3	
295	TFILNO(1-2,2,3)-AD	Fuc α -2Gal β -3GlcNAc β -3Gal β -4GlcNAc β -6 Fuc α -3 Gal β -4Glc-AD Fuc α -2Gal β -3GlcNAc β -3	
320	B-III dodecaosylceramide	GaH β -3Gal β -4GlcNAc β -6 Fuc α -2 Gal β -4GlcNAc β -3Gal β -4Glc β -Cer GaH β -3Gal β -4GlcNAc β -3 Fuc α -2	
558	Hep-4-AO*	SU-2 Δ UA-4GlcNS α -4IdoA α -4GlcNS-AO SU-6 SU-2 SU-6	
638	GN3-AO	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
639	GN4-AO*	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
643	GN7-AO*	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
644	GN8-AO*	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
645	GlcN4-AO (chitosan)	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
646	GlcN5-AO (chitosan)	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
647	GlcN6-AO (chitosan)	GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc β -4GlcNAc-AO	
794	Barley-16-AO*	(Glc β -4/3Glc β)7-4Glc β -3Glc-AO	
809	Lentin-2-AO	Glc β -2(3-3/6)-AO	
851	Xyl-6(β 4)-AO	Xyl β -4(Xyl β -4Xyl β -4Xyl β -4Xyl β -4Xyl β -AO	
893	NeuAc	NeuAc-DH	
900	(6P)-Glc-AO	P-6Glc-AO	
901	(6P)-Man	P-6Mann-DH	
902	(6P)-Man-AO	P-6Mann-AO	
925	Carra-Hexa-4S	aGal β -3Gal β -4aGal α -3Gal β -4aGal α -3Gal-DH SU-4 SU-2 SU-4 SU-4	
926	Carra-Octa-4S	aGal β -3Gal β -4aGal α -3Gal β -4aGal α -3Gal β -4aGal α -3Gal-DH SU-4 SU-4 SU-4 SU-4	
927	Gal-Mannan DP2-AO	Galactomannan DP2-AO	
934	Gal-Mannan DP6b-AO	Galactomannan DP6 (DP5) AO (TLC -2) (Ehrlichmann219)	
958	GalAra(1-3)-AO	GaB β -3Ara-AO	

0-10% >10-30% >30-70% >70-100%



Fig 3. Relative binding intensities of PeRoL to microarray probes. Relative binding intensities (5 fmol per spot) are shown as the percentage of the fluorescence signal intensity relative to that given by Barley-16-AO*, the probe most strongly bound.

4 Conclusão

PeRoL apresentou efeitos sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, além de impedirem a formação de biofilme dos dois microrganismos analisados. A atividade antifúngica de PeRoL pode ser decorrente da ligação a parede celular uma vez que a lectina se ligou a resíduos de quitina e outros glicanos que apresentam ligações β 1-3.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por bolsas de pesquisa (P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo: 88881.187038/2018-01. Os autores agradecem a Carlos Eduardo Sales da Silva pela assistência técnica.

Referências

- ABRUZZO, George K. et al. Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2310-2318, 2000.
- BERMAN, Judith; KRYSAN, Damian J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-13, 2020.
- BONGOMIN, Felix et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.
- DA SILVA, Pollyanna Michelle et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018.
- DE MELO NASCIMENTO, Janilde et al. Medicinal flora of the Maranhão, Brazil: plants species and their therapeutic indications in popular use. **Nature and Conservation**, v. 13, n. 1, p. 61-76, 2020.
- DOI, André Mario et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS one**, v. 11, n. 1, 2016.
- DOMINGUEZ, E. G. et al. Conserved role for biofilm matrix polysaccharides in Candida auris drug resistance. **MSphere**, v. 4, n. 1, p. e00680-18, 2019.
- ENOCH, David A. et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections. In: **Human Fungal Pathogen Identification**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 17-65.
- FERREIRA, Gustavo Ramos Salles et al. Antimicrobial potential of Alpinia purpurata lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 152-162, 2018.
- FOX, Emily P. et al. An expanded regulatory network temporally controls C andida albicans biofilm formation. **Molecular microbiology**, v. 96, n. 6, p. 1226-1239, 2015.

GABIUS, H.-J. et al. Sweet complementarity: the functional pairing of glycans with lectins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 73, n. 10, p. 1989-2016, 2016.

GEMEDE, Habtamu Fekadu; RATTA, Negussie. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 4, p. 284-289, 2014.

GOMES, Bruno Severo et al. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 770-778, 2012.

GULATI, Megha; NOBILE, Clarissa J. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and infection**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

HECTOR, Richard F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 1, p. 1-21, 1993.

HIREMATH, Kavita Y. et al. A lectin with anti-microbial and anti proliferative activities from Lantana camara, a medicinal plant. **Protein Expression and Purification**, v. 170, p. 105574, 2020.

HÖFS, Sarah; MOGAVERO, Selene; HUBE, Bernhard. Interaction of Candida albicans with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

HRABOVSKÝ, Vladimír et al. Distribution and antifungal susceptibility of yeasts isolates from intensive care unit patients. **Folia microbiologica**, v. 62, n. 6, p. 525-530, 2017.

KVASNICKOVA, Eva et al. Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on Candida parapsilosis and Candida krusei biofilm using a Cellavista device. **Journal of microbiological methods**, v. 118, p. 106-112, 2015.

LANIADO-LABORÍN, Rafael; CABRALES-VARGAS, Maria Noemí. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LEROY, Olivier et al. Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. **Annals of intensive care**, v. 6, n. 1, p. 2, 2016.

LIU, Yan et al. Neoglycolipid-based oligosaccharide microarray system: preparation of NGLs and their noncovalent immobilization on nitrocellulose-coated glass slides for microarray analyses. In: **Carbohydrate Microarrays**. Humana Press, 2012. p. 117-136.

MOTOA, Gabriel et al. Epidemiology of Candida isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. **Revista iberoamericana de micología**, v. 34, n. 1, p. 17-22, 2017.

NAGLIK, Julian R.; GAFFEN, Sarah L.; HUBE, Bernhard. Candidalysin: discovery and function in Candida albicans infections. **Current opinion in microbiology**, v. 52, p. 100-109, 2019.

NICOLA, André Moraes et al. Antifungal drugs: new insights in research & development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 195, p. 21-38, 2019.

OURABAH, Asma et al. Anti-Candida albicans biofilm activity of extracts from two selected indigenous Algerian plants: Clematis flammula and Fraxinus angustifolia. **Journal of Herbal Medicine**, p. 100319, 2019.

PAIVA, Patricia MG; COELHO, Luana CBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from Cratylia mollis mart.(camaratu bean). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PALMA, Angelina S. et al. Ligands for the β -glucan receptor, Dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5771-5779, 2006.

PAPON, Nicolas et al. Emerging and emerged pathogenic Candida species: beyond the Candida albicans paradigm. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

PEIXOTO, Larissa Rangel et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of Laurus nobilis Linnaeus essential oil against Candida spp. **Archives of oral biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.

PFALLER, Michael A. et al. In vitro activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2608-2616, 2013.

POULAIN, Daniel. Candida albicans, plasticity and pathogenesis. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2015.

ROEMER, Terry; KRYSAN, Damian J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703, 2014.

SARTIM, Marco A. et al. Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from Bothrops jararacussu snake venom. **Toxicon**, v. 126, p. 59-69, 2017.

STOLL, M. S.; FEIZI, Ten. Software tools for storing, processing and displaying carbohydrate microarray data. In: **Proceeding of the Beilstein Symposium on Glyco-Bioinformatics**. 123-140 2009 Beilstein Institute for the Advancement of Chemical Sciences Frankfurt, Germany, 2009. p. 4-8.

STROLLO, Sara et al. Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002–2012. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 1, p. 7, 2017.

SULTANA, Mst et al. Identification of lectins from the seeds of Bangladeshi plants *Sesbania bispinosa* and *Senna occidentalis* by hemagglutination assay. **Asian Journal of Green Chemistry**, v. 3, n. 4, pp. 418-549, p. 518-524, 2019.

TORRES, Michelly Élen Leal Menezes et al. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. **Process Biochemistry**, v. 86, p. 169-176, 2019.

TSUI, Christina; KONG, Eric F.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

ZHANG, Peng et al. Imaging the microprocesses in biofilm matrices. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 214-226, 2019.

4 CONCLUSÃO

Extratos orgânicos de folhas e caule de *P. elatior*, contendo flavonoides e derivados cinâmicos como compostos majoritários, apresentaram atividade antioxidante e anticâncer contra leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda e leucemia promielocítica aguda. Os extratos não apresentaram atividade citotóxica sobre células saudáveis e nem atividade hemolítica.

Uma lectina da raiz de *Portulaca elatior* foi isolada e denominada PeRoL. Estudos de caracterização estrutural revelaram que a lectina reconhece carboidratos livre e glicoproteínas, é homodimérica e tem natureza ácida. PeRoL tem atividade, antibacteriana contra isolados multirresistentes e não apresenta toxicidade para células humanas da linhagem branca e vermelha. PeRoL apresentou efeito sinérgico com antibióticos comerciais e atividade antifúngica e anti-biofilme contra espécies de *Candida*, reconhecendo carboidratos presentes na parede celular desses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1394-1398, 2011.
- ALBUQUERQUE, Rosemary Jorge de Mendonça et al. Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* are efficacious in guinea pig ovalbumin-induced allergic conjunctivitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 953-962, 2011.
- ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALVES, Jose Jakson Amancio; DE ARAÚJO, Maria Aparecida; DO NASCIMENTO, Sebastiana Santos. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.
- ALVES, Jose Jakson. Geoecologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro. **CLIMEP-Climatologia e Estudos da Paisagem**, v. 2, n. 1, 2007.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ARAÚJO DE LIMA, Cirlane Alves et al. A etnobotânica aplicada à úlcera gástrica e avaliação farmacológica de *Solanum stipulaceum*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2017.
- ARAÚJO, Aurigena Antunes et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.
- ARAÚJO, Camila de Souza et al. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from leaves of *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae). **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 43, p. 615, 2015.
- ARAÚJO, Regina MS et al. A new exogen anticoagulant with high selectivity to intrinsic pathway of coagulation. **Thrombosis research**, v. 128, n. 4, p. 395-397, 2011.
- ARAÚJO, Thiago Antônio de Sousa et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.
- BABY, Sabulal; JOHNSON, Anil John; GOVINDAN, Balaji. Secondary metabolites from *Ganoderma*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 66-101, 2015.
- BACHA, Flávia Barbieri et al. Experimental poisoning by *Enterolobium contortisiliquum* in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2017.

BAH, Clara Shui Fern; FANG, Evandro Fei; NG, Tzi Bun. Medicinal applications of plant lectins. In: **Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 55-74.

BAIG, Sharmin et al. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 74-76, 2018.

BARROS, Livia Moreira et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 429-435, 2012.

BAUER, Danielle; SANTOS, E. L.; SCHMITT, Jairo Lizandro. Avaliação da decomposição de serapilheira em dois fragmentos de Caatinga no Sertão Paraibano. **Pesquisas Botânica**, v. 69, p. 307-318, 2016.

BIASI-GARBIN, Renata Perugini et al. Antifungal potential of plant species from Brazilian Caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

BOLETI, Ana Paula de A. et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, 2007.

BRAGA, Alana Araújo et al. Antibacterial and hemolytic activity of a new lectin purified from the seeds of *Sterculia foetida* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1689-1699, 2015.

CAMACHO, Natália Neutzling. **Expressão heteróloga da lectina de Bauhinia forficata Link em Escherichia coli e efeito sobre linhagens celulares tumorais**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

CAROLIN, R. C. Portulacaceae. In: **Flowering Plants· Dicotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1993. p. 544-555.

CARVALHO, Aline de Souza et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

CASTRO, Valerium Thijian Nobre de Almeida. **Atividade anticolinesterásica de plantas da Caatinga com indicação popular para distúrbios do sistema nervoso**. 2016. Tese de Doutorado.

CAVALCANTI, Maria Vitória Lages et al. Ocorrência de intoxicação em caprinos pelas favas de “pau mocó” nas áreas de brejinho e de corredores no município decampo maior no piauí. **Revista IESM**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2017.

CHEN, Chang-Shan et al. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 3, 2018.

CHEYNIER, Véronique. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 223S-229S, 2005.

CHIRIAC, C.; TANASA, Fulga; ONCIU, Marioara. A novel approach in cinnamic acid synthesis: direct synthesis of cinnamic acids from aromatic aldehydes and aliphatic carboxylic acids in the presence of boron tribromide. **Molecules**, v. 10, n. 2, p. 481-487, 2005.

COELHO, A. A. O. P. et al. Synonymies and typifications in Portulaca (Portulacaceae) of Brazil. **Kew Bulletin**, v. 65, n. 1, p. 37-43, 2010.

COELHO, Alexa Araujo de Oliveira Paes; GIULIETTI, Ana Maria. O gênero Portulaca L.(Portulacaceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 655-670, 2010.

COMPEAN, K. L.; YNALVEZ, R. A. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 8, n. 5, p. 204-213, 2014.

COSTA, Wêndeo Kennedy et al. Essential oil from Eugenia stipitata McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112059, 2020.

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

DANTAS, Alexandre Cruz et al. Intoxicação natural por comigo-ninguém-pode (Dieffenbachia sp.) em caprino. **Ciênc. Vet. Trop**, v. 10, p. 119-123, 2007.

DAS, Chandan; DHAR, Shrikant Kumar; BEHERA, Debasmita. Antifungal Sensitivity of Candida Sp. Isolated from Skin Infections at a Tertiary Care Teaching Hospital. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 10, n. 10, p. 392-396, 2019.

DE, Prithwiraj; BALTAS, Michel; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672-1703, 2011.

DEL RIO, Marianela et al. Internalization of a sunflower mannose-binding lectin into phytopathogenic fungal cells induces cytotoxicity. **Journal of plant physiology**, v. 221, p. 22-31, 2018.

DELEO, Frank R.; DIEP, Binh An; OTTO, Michael. Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

DELORME, Thierry et al. Genotypic and phenotypic variations in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from outpatient, inpatient and nursing homes. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 3, p. 316-325, 2019.

DESAI, Siddhi; SANGHRAJKA, Kinjal; GAJJAR, Devarshi. High Adhesion and Increased Cell Death Contribute to Strong Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 277, 2019.

DEWICK, Paul M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, v. 3, 2009.

DINIZ, Tâmara Coimbra et al. Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074-1087, 2019.

DÔRES, R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, MG.

DUFRENE, Yves F. Sticky microbes: forces in microbial cell adhesion. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 6, p. 376-382, 2015.

EL-HOUSSAINI, Houdaii H. et al. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 13-19, 2019.

FARIAS, Renally Cardoso et al. Riqueza florística em uma área ciliar de caatinga no Cariri Ocidental da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 4, n. 7, p. 109-118, 2017.

FERNANDES, Moabe Ferreira; QUEIROZ, Luciano Paganucci de. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e cultura**, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FLAMBÓ, Diana Filipa Afonso Lopes Peres. **Atividades biológicas dos flavonoides: Atividade antimicrobiana**. 2013. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

FOSTER, Timothy J. Immune evasion by staphylococci. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-958, 2005.

FREIRE, José EC et al. Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.

FUKUI, Shigeyuki et al. Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1011, 2002.

GABIUS, H.-J. et al. Sweet complementarity: the functional pairing of glycans with lectins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 73, n. 10, p. 1989-2016, 2016.

GALIZA, Glauco JN et al. Intoxicação por *Portulaca elatior* (Portulacaceae) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 465-470, 2011.

GARDNER, Stewart G. et al. Metabolic mitigation of *Staphylococcus aureus* vancomycin intermediate-level susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01608-17, 2018.

GEMEDE, Habtamu Fekadu; RATTA, Negussie. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 4, p. 284-289, 2014.

GODULA, Kamil. Following sugar patterns in search of galectin function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 11, p. 2548-2550, 2018.

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

GOOTZ, Thomas D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 30, n. 1, 2010.

GUO, Liang et al. Reactive oxygen species inhibit biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. **Microbial pathogenesis**, v. 127, p. 183-189, 2019.

HAWKEY, Peter M.; JONES, Annie M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. suppl_1, p. i3-i10, 2009.

HILLER, Ekkehard et al. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host—focus on the function of cell wall proteins. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 384-389, 2011.

IORDACHE, Florin et al. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

ISSAM, AL-Ani et al. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 245-255, 2015.

ITAKURA, Yoko et al. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1160, 2017.

JOHN, Fatima Clement; TABBASUM, Khatija; RAO, Chebrolu P. Chemico-biological aspects of plant lectins with a preference to legume lectins. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2013. p. 359-381.

JONES, Tyler H. et al. Novel antifungal activity for the lectin scytovirin: inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 755, 2017.

KARNCHANATAT, Aphichart. Antimicrobial activity of lectins from plants. **Antimicrobial agents. InTech**, p. 145-178, 2012.

KONG, Cin et al. Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

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

LATGÉ, Jean-Paul. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.

LEAL, Inara R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LEDERMAN, Edith R.; CRUM, Nancy F. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. **American Journal of Gastroenterology**, v. 100, n. 2, p. 322-331, 2005.

LEE, Yean-Jang et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 2281-2289, 2003.

LENMAN, Annasara et al. Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 18, p. E4264-E4273, 2018.

LEONG, Lex Ee Xiang et al. Fluoroacetate in plants-a review of its distribution, toxicity to livestock and microbial detoxification. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 55, 2017.

LI, Bei et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071-1081, 2014.

LIMA, Amélia Ruth Nascimento et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, p. 121911770, 2020.

LIMA, Thâmarah A. et al. Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva* in the gut of *Nasutitermes corniger* workers. **Pest management science**, v. 74, n. 7, p. 1593-1599, 2018.

LIMPER, Andrew H. et al. Fungal infections in HIV/AIDS. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e334-e343, 2017.

LIN, Shiqi et al. Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: biomass, viability and matrix. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 285-291, 2017.

LIRA TEIXEIRA, Luciane et al. Physicochemical Characterization and Phenolic Profile of Oiti Fruits (*Licania tomentosa* Benth Frisch). **Journal of Nutrition, Food Research and Technology**, v. 2, n. 1, p. 7-12, 2019.

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

LIU, Yi-Yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LIVERMORE, David M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical infectious diseases**, v. 36, n. Supplement_1, p. S11-S23, 2003.

LOURENÇO, Frederico Miguel da Conceição. **Assignment of new roles for malectin-like domains to understand their divergent evolution**. 2017. Tese de Doutorado.

LOWY, Franklin D. Staphylococcus aureus infections. **New England journal of medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

LUZ, Jefferson Romário Duarte da et al. Thrombin Inhibition: Preliminary Assessment of the Anticoagulant Potential of *Turnera subulata* (Passifloraceae). **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 4, p. 384-392, 2019.

MACESIC, Nenad et al. Emergence of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* through diverse genetic adaptations: A genomic, retrospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, 2019.

MACHADO, Hussen et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, 2008.

MATIN, Somaie et al. Comparison of placenta PCR and maternal serology of aborted women for detection of *Toxoplasma gondii* in Ardabil, Iran. **The Korean journal of parasitology**, v. 55, n. 6, p. 607, 2017.

MAYER, Sabine et al. C-type lectin receptor (CLR)-Fc fusion proteins as tools to screen for novel CLR/bacteria interactions: an exemplary study on preselected *Campylobacter jejuni* isolates. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 213, 2018.

MCQUILLAN, Alyssa M. et al. Natural and Synthetic Sialylated Glycan Microarrays and Their Applications. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 6, p. 88, 2019.

MEDEIROS, R. M. et al. Intoxication of goats by *Plumbago scandens* in Northeastern Brazil. **Veterinary and human toxicology**, v. 43, n. 3, p. 167-169, 2001.

MENEGUELLI, A. Z.; *et al.* A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na saúde pública brasileira. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**, v. 1, n. 1, p. 2-12, 2017.

MEYER, Gabriela; PICOLI, Simone Ulrich. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 24-31, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Bioma Caatinga. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Data de acesso: 10/02/2020.

MOELLERING JR, Robert C. NDM-1—a cause for worldwide concern. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 25, p. 2377-2379, 2010.

MONTEIRO, R. M.; MOREIRA, A. C. O. M. Aplicação da lectina de sementes de *Amburana cearensis* como marcador na identificação de microrganismos. **XII Simposio de plantas medicinais do Brasil**. 2002.

MOREHEAD, Martha Shawn; SCARBROUGH, Catherine. Emergence of global antibiotic resistance. **Primary care: clinics in office practice**, v. 45, n. 3, p. 467-484, 2018.

MOURA, M. C. et al. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861-874, 2017.

MOURA, M. C. et al. 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. et al. 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.

MUBAIWA, Tsitsi D. et al. The glycointeractome of serogroup B *Neisseria meningitidis* strain MC58. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

NAIR, Sindhu Syama et al. Comparative analysis of the antibacterial activity of some phytolectins. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 2, p. 18-22, 2013.

NAMRATHA, K. G. et al. Characterization and antibiogram of *Klebsiella* spp. isolated from clinical specimen in a rural teaching hospital. **Sch. J. App. Med. Sci**, v. 3, n. 2E, p. 878-883, 2015.

NATION, Roger L. et al. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. **The Lancet infectious diseases**, v. 15, n. 2, p. 225-234, 2015.

NYFFELER, Reto; EGGLI, Urs. An up-to-date familial and suprafamilial classification of succulent plants. **Bradleya**, v. 2010, n. 28, p. 125-144, 2010.

OHFUJI, S. Pustular rumenitis associated with epithelial akertosis, dyskeratosis, and parakeratosis in steers: report of two cases. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 4, p. 757-762, 2016.

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 643, 2014.

OLAITAN, Abiola Olumuyiwa et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an

epidemiological and molecular study. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 6, p. 500-507, 2014.

OLIVEIRA MACHADO FILHO, Hermes; DE MELO, José Iranildo Miranda; SALES, Margareth Ferreira. Flora da região de Xingó, Alagoas-Sergipe: Portulacaceae sensu lato. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 103-108, 2012.

OLIVEIRA NETO, Temístocles Soares de et al. Intoxicação por *Portulaca elatior* (Portulacaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 785-789, 2017.

OLIVEIRA, Hadelândia Milon de; SILVA, Cristiane Pavanello Rodrigues; LACERDA, Rúbia Aparecida. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: a conceptual analysis. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 3, p. 505-511, 2016.

OLIVEIRA, Magno Ferreira; SISENANDO, Herbert Ary. Plantas Tóxicas: um Risco Quase Invisível à Saúde Infantil. **UNICIÊNCIAS**, v. 21, n. 2, p. 115-119, 2017.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. Klebsiella pneumoniae: going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PAGÈS, Jean-Marie; JAMES, Chloë E.; WINTERHALTER, Mathias. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 893-903, 2008.

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

PAIVA, Patrícia MG et al. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: **Insecticides-advances in integrated pest management**. IntechOpen, 2012.

PAIVA, Patricia MG; COELHO, Luana CBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart.(camaratu bean). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PALMA, Angelina S. et al. The neoglycolipid (NGL)-based oligosaccharide microarray system poised to decipher the meta-glycome. **Current opinion in chemical biology**, v. 18, p. 87-94, 2014.

PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PEREIRA JÚNIOR, Lécio Resende et al. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509-520, 2014.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. p. 1-10.

PERUGINI, Marcia Regina Eches et al. Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1Supl, p. 275-282, 2015.

PESSOA, Clarice RM; MEDEIROS, Rosane MT; RIET-CORREA, Franklin. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 752-758, 2013.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PODSCHUN, Rainer; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

POMAKOVA, D. K. et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 981-989, 2012.

PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. 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.

PUPIN, Rayane C. et al. *Enterolobium contortisiliquum* is a cause of acute ruminal acidosis in sheep. **Toxicon**, v. 126, p. 90-95, 2017.

QADIR, Sakeena et al. Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n. 11, p. 999, 2013.

RABBANI, Said et al. Mutation of Tyr137 of the universal *Escherichia coli* fimbrial adhesin FimH relaxes the tyrosine gate prior to mannose binding. **IUCrJ**, v. 4, n. 1, p. 7-23, 2017.

RASIGADE, Jean-Philippe; VANDENESCH, François. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 510-514, 2014.

RÊGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo et al. Evaluation of WGA and Concanavalin A (Con A) lectin as biomarkers of hepatosplenic schistosomiasis in human biopsies with no evidence of egg-granuloma system. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 213-215, 2013.

RIBEIRO, M. D. et al. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 2, p. 263-270, 2006.

RIET-CORREA, F. et al. Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock. **UFMG, Campina Grande/PB. 246p**, 2009.

RIET-CORREA, F. et al. Toxic plants for livestock in Brazil: toxic species, economic impact and public health. In: **Proc. 8th Int. Symposium on Poisonous Plants, Logan, Utah**. 2006.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. del C. Intoxicações por plantas e micotoxinas. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**, v. 2, p. 99-219, 2007.

RIET-CORREA, Franklin et al. Toxic plants affecting the nervous system of ruminants and horses in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1357-1368, 2017.

RIET-CORREA, Franklin; MEDEIROS, Rosane MT. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

RIET-CORREA, Franklin; MEDEIROS, Rosane MT; SCHILD, Ana Lucia. A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 245-254, 2012.

ROCHA, Edmilson de Oliveira et al. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. 2011. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia.

SADEKUZZAMAN, M. et al. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 491-509, 2015.

SANDER, P. et al. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. **Molecular microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1295-1304, 2002.

SANTANA, Giselly Maria de Sá et al. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTIN, Rodrigo; LAJUS, Cristiano Reschke; KLEIN, Claudia. Potencial alelopático de diferentes extratos de aveia, azevém, nabo e consórcio no crescimento inicial do milho em laboratório e a campo. **Seminário de Iniciação Científica, Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e Mostra Universitária**, 2017.

SANTOS, Maria O. et al. The conservation of native priority medicinal plants in a Caatinga area in Ceará, northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2675-2685, 2017.

SARTIM, Marco A. et al. Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 126, p. 59-69, 2017.

SCHALLUS, Thomas et al. Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 8, p. 3404-3414, 2008.

SELVARAJ, K.; CHOWDHURY, Ranjana; BHATTACHARJEE, Chiranjib. Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and

evaluation of free radical scavenging activity. **Int J Pharm Sci**, v. 5, n. 3, p. 743-9, 2013.

SHARMA, Prateek. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 3, n. 2, p. 403-423, 2011.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 14, p. 3198-3208, 1990.

SILVA, Kleber Andrade da; ARAÚJO, Elcida de Lima; FERRAZ, Elba Maria Nogueira. Estudo florístico do componente herbáceo e relação com solos em áreas de caatinga do embasamento cristalino e bacia sedimentar, Petrolândia, PE, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 23, n. 1, p. 100-110, 2009.

SILVA, Maria Cristina et al. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 103-107, 2010.

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

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

SILVA, Vanessa et al. First report of linezolid-resistant cfr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in Portugal. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 17, p. 323-325, 2019.

SILVA, Víctor et al. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista chilena de infectología**, v. 19, p. 149-156, 2002.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SOLÁROVÁ, Zuzana et al. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 87, 2020.

SOUZA, Larissa Isabela Oliveira et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055-1064, 2017.

STEFANIUK, E. et al. Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 1363-1369, 2016.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TANG, P. W. et al. Novel approach to the study of the antigenicities and receptor functions of carbohydrate chains of glycoproteins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 132, n. 2, p. 474-480, 1985.

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

TOKARNIA, Carlos Hubinger et al. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 1-2, p. 1-10, 1990.

TOKARNIA, Carlos Hubinger; JÜRGEN, Döbereiner; VARGAS PEIXOTO, Paulo. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro, BR: Helianthus, 2000.

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

TONG, Yiqing; TANG, Jianguo. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological research**, v. 198, p. 27-35, 2017.

VAN BUUL, Vincent J.; BROUNS, Fred JPH. Health effects of wheat lectins: A review. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 2, p. 112-117, 2014.

VANDENBORRE, Gianni; SMAGGHE, Guy; VAN DAMME, Els JM. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VARROT, Annabelle; BLANCHARD, Bertrand; IMBERTY, Anne. Lectin binding and its structural basis. **Carbohydr. Recogn**, p. 329-347, 2011.

VASTA, Gerardo R. et al. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 199, 2012.

VENDELE, Ingrida et al. Mannan detecting C-type lectin receptor probes recognise immune epitopes with diverse chemical, spatial and phylogenetic heterogeneity in fungal cell walls. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 1, p. e1007927, 2020.

WALSH, Christopher; WENCEWICZ, Timothy. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. **John Wiley & Sons**, 2020.

WEI, Hanwen et al. Discovery of novel piperonyl derivatives as diapophytoene desaturase inhibitors for the treatment of methicillin-, vancomycin-and linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **European journal of medicinal chemistry**, v. 145, p. 235-251, 2018.

WILCOX, Mark et al. Reporting elevated vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: consensus by an International Working Group. **Future microbiology**, v. 14, n. 4, p. 345-352, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. **Joint News Release**, v. 29, 2019.

XIE, Yixi et al. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

YAHAV, Dafna et al. The association of vancomycin trough levels with outcomes among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections: Retrospective cohort study. **PloS one**, v. 14, n. 4, 2019.

YANG, Yun et al. Characterization, molecular cloning, and in silico analysis of a novel mannose-binding lectin from *Polygonatum odoratum* (Mill.) with anti-HSV-II and apoptosis-inducing activities. **Phytomedicine**, v. 18, n. 8-9, p. 748-755, 2011.

ZABEL, Robert A.; MORRELL, Jeffrey J. **Wood microbiology: decay and its prevention**. Academic press, 2012.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

***Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities.**

doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.188



Fator de Impacto: 4.784 (JCR 2019)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities

José Dayvid Ferreira da Silva ^a, Suéllen Pedrosa da Silva ^a, Pollyanna Michelle da Silva ^a, Amanda Mota Vieira ^c, Larissa Cardoso Correa de Araújo ^a, Thâmarah de Albuquerque Lima ^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira ^a, Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho ^b, Maira Galdino da Rocha Pitta ^b, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo ^b, Irapuan Oliveira Pinheiro ^c, Russolina Benedeta Zingali ^d, Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti ^c, Thiago Henrique Napoleão ^{a,*}, Patrícia Maria Guedes Paiva ^{a,*}

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

^b Departamento de Inovação Terapêutica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2018

Received in revised form 20 December 2018

Accepted 21 December 2018

Available online 22 December 2018

Keywords:

Plant lectin

Antibacterial

Antifungal

Cytotoxicity

ABSTRACT

Lectins are carbohydrate-binding proteins broadly distributed in plants and have several biological functions, including antimicrobial action. *Portulaca elatior* is a Caatinga plant whose chemical composition and biotechnological potential have not been extensively studied. In this work, a lectin was isolated from *P. elatior* root extract and evaluated for antimicrobial activity. The *P. elatior* root lectin (PeRoL) showed native molecular mass of 33 kDa, pI 3.8 and is comprised of two subunits of 15 kDa linked by disulfide bonds. No sequence similarities with Viridiplantae proteins were observed. The PeRoL hemagglutinating activity (HA) was not affected by heating and was detected in a pH ranging from 4.0 to 8.0. Trehalose was identified as an endogenous inhibitor of PeRoL present in the roots. Bacteriostatic activity was detected against *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (minimal inhibitory concentration of 8.1, 32.5 and 4.06 µg/mL, respectively). PeRoL induced the death of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, and *Candida tropicalis* cells, with a minimal fungicidal concentration of 16 µg/mL. The lectin (100 µg/mL) was not cytotoxic to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and did not show hemolytic activity. In conclusion, the roots of *P. elatior* contain a trehalose-binding, thermostable, and antimicrobial lectin.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Brazilian semiarid region (Caatinga) contains several plants used for medicinal purposes and that have pharmacological potential. Caatinga is a tropical savanna-like and dry forest that covers >800,000 km² in northeast Brazil [1]. It contains the largest amount of tropical semiarid vegetation in South America with more than 300 endemic plant species [2]. The identification of bioactive compounds in Caatinga plants can promote biotechnological development and stimulate conservation of this region [3].

The *Portulaca* genus includes about 120 species, among which *Portulaca oleraceae* highlights due to its neuropharmacological (anti-convulsant and antinociceptive effects) action as well as antioxidant activity and nutritional potential [4–6]. Thirteen species have been reported in

Brazil [7] and, among the species of this genus described in Caatinga, *Portulaca elatior* Mart. ex Rohrb has not been the subject of any published biotechnological studies.

Lectins are carbohydrate-binding proteins that interact in a reversible way with mono-, oligo-, and polysaccharides with high specificity [8]. This class of proteins is widely found in plants and includes molecules with diverse structures and many biological properties [8,9]. Some lectins can be biotechnologically applied in drug-development research and as insecticidal agents [8,10]. It has been also reported that lectins have anti-inflammatory [11], antimicrobial [12], and antitumoral [13] activities.

The antibacterial activity of lectins has been attributed to their interaction with glycans found at the bacterial cell wall (e.g., teichoic and teichuronic acids, peptidoglycan, and lipopolysaccharide) [14]. In addition, antibacterial lectins can promote protein leakage and formation of pores in the cell wall [15,16]. The antifungal activity of lectins can result from interaction with chitin, α-mannan, and β-glucan present in the cell walls, which can lead to growth inhibition, cell wall disruption,

* Corresponding authors.

E-mail addresses: thiago86@yahoo.com.br (T.H. Napoleão), paivaufpe@yahoo.com.br (P.M.G. Paiva).

reduced absorption of nutrients, and interference with spore germination [12,17,18].

This work aimed to isolate and characterize a lectin (called PeRoL) from a saline extract of *P. elatior* roots as well as evaluate its antimicrobial activity. In addition, the toxicity of PeRoL to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and its hemolytic activity were evaluated. The study is the first reporting a bioactive protein from *P. elatior*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ammonium sulfate was purchased from Neon Comercial (São Paulo, Brazil). Calcium chloride, chloridric acid, magnesium chloride, sodium chloride, sodium hydroxide and sulfuric acid were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Acetic acid was purchased from Química Moderna (Recife, Brazil). *N*-acetyl-D-glucosamine, bis (8-anilino)naphthalene-1-sulfonate [bis-ANS], bovine serum albumin, casein, chitin from shrimp shells, chitosan, citric acid, Coomassie Brilliant Blue R-250, culture media, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dinitrosalicylic acid, fetuin, Folin phenol reagent, D-galactose, D-glucose, glutaraldehyde, glycerol, glycine, inulin, D-mannose, β-mercaptoethanol, molecular mass markers, ovalbumin, potassium phosphate, D-ribose, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium phosphate, thyroglobulin, trehalase from porcine kidney, D-trehalose, Tris, Triton X-100, and xylan were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trypsin for protein mass spectrometry was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Bromophenol blue, CHAPS, Ficoll-Hypaque, and IPG buffer were purchased from GE Healthcare Life Sciences (Sweden).

2.2. Preparation of extracts

P. elatior specimens were collected in Aroeiras (Paraíba, Brazil) with authorization (no. 38690) from the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade of the Brazilian Ministry of Environment. The access was recorded (A52425E) in the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). The roots were separated and dried in an incubator (56 °C) for 5 days. The dried material was milled using a blender, and the root powder was suspended in 0.15 M NaCl in a proportion of 1:10 (w/v). After stirring for 6 h at 28 °C, the extract was obtained by filtration through filter paper and centrifugation (9000g; 15 min, 4 °C).

2.3. Measurement of protein concentration and hemagglutinating activity (HA)

The concentration of proteins was estimated according to Lowry et al. [19] using a standard curve (31.25 to 500 µg/mL) of bovine serum albumin. The HA was investigated according to Paiva and Coelho [20] in V-bottomed 96-well microplates. The sample (50 µL) was two-fold serially diluted in 0.15 M NaCl and then it was added 50 µL of a suspension (2.5% v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde [21] in each well. The plate was incubated at 27 °C for 45 min. In the control, the erythrocyte suspension was incubated in absence of a sample. The HA was expressed as the reciprocal (titer⁻¹) of the highest dilution of sample able to promote agglutination. Specific HA (SHA) was calculated by the ratio between the hemagglutinating activity and the protein concentration (mg/mL).

2.4. Isolation of PeRoL

The root extract was precipitated with ammonium sulfate at different saturations, but neither the precipitates nor the supernatants presented HA. Then, the extract (2 mL; 10.26 mg of protein) was loaded onto a chitin column (7.5 × 1.5 cm) previously equilibrated

(0.3 mL/min) with 0.15 M NaCl. The unadsorbed proteins were removed with 0.15 M NaCl. Next, 1.0 M acetic acid was passed through the column to elute the adsorbed proteins. The eluted fractions with absorbance higher than 0.1 were pooled (PeRoL) and dialyzed against 0.15 M NaCl during 8 h (one liquid change each 2 h).

2.5. Lectin characterization

2.5.1. Determination of native molecular mass

PeRoL (2 mL; 1 mg of protein) was submitted to gel filtration chromatography on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR column coupled to the ÄKTAprime plus system (GE Healthcare Life Sciences, Sweden). The chromatography was performed using 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. The fractions collected (3.0 mL) were monitored for absorbance at 280 nm. The relative molecular mass of PeRoL was calculated by comparing its migration time with those of the marker proteins: bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), and lysozyme (14 kDa).

2.5.2. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

PeRoL (100 µg) was submitted to SDS-PAGE under non-reducing or reducing (treatment with β-mercaptoethanol) conditions, according to Laemmli [22]. Polypeptide bands of PeRoL and molecular mass standards (phosphorylase b, 97 kDa; bovine albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; bovine carbonic anhydrase, 29 kDa; soybean trypsin inhibitor, 20.1 kDa; α-lactalbumin, 14.4 kDa) were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid.

2.5.3. Mass spectrometry

The PeRoL polypeptide band obtained by SDS-PAGE under non-reducing conditions was excised from the gel and submitted to discoloration, drying, and tryptic digestion as described by Lima et al. [23]. The peptides were analyzed using a Q-TOF spectrometer (Waters, Milford, USA), and the spectra obtained were compared with those present in NCBI nr database using the MASCOT software search engine.

2.5.4. Isoelectric focusing

The isoelectric point of the PeRoL was determined with the isoelectric focusing technique using the IPGPhor III system (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) according to the manufacturer's instructions. PeRoL (200 µg) was solubilized in rehydration buffer (2% [w/v] CHAPS, 1% [v/v] IPG buffer pH 3–10, 0.002% [w/v] bromophenol blue), and taken into IPG strips. After running, the strip was stained with 0.2% (w/v) Coomassie Blue R-250 in 40% (v/v) ethanol and 10% (v/v) acetic acid for 3 h. The analysis was performed using the ImageMaster software (GE Healthcare Life Sciences, Sweden).

2.5.5. Determination of carbohydrate-binding specificity

The carbohydrate-binding specificity of PeRoL was determined by an HA inhibition assay, replacing the 0.15 M NaCl by solutions of glycidic molecules. The assays used the carbohydrates (0.2 M) D-galactose, D-mannose, D-glucose, D-trehalose, *N*-acetyl-D-glucosamine, D-ribose, xylan, chitosan, and inulin and the glycoproteins (500 µg/mL) fetuin, casein, ovalbumin, and thyroglobulin. After dilution of the sample in the glycidic solutions, the assay was incubated for 15 min before the addition of rabbit erythrocyte suspension.

2.5.6. Determination of effects of pH, temperature and ions on PeRoL HA and conformation

The thermal stability of PeRoL HA was evaluated by incubating the lectin at different temperatures (30–100 °C in water bath and 121 °C in autoclave) for 30 min prior to the assay. The effect of pH on HA was determined using lectin samples previously incubated for 15 min in the following solutions: 10 mM glycine-HCl pH 4; 10 mM citrate phosphate buffer, pH 5 and 6; 10 mM sodium phosphate pH 7; 10 mM Tris-HCl, pH 8, 9 and 10; and NaOH pH 11 and 12. The HA of PeRoL was also

determined in presence of divalent ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}). For this, the NaCl solution was replaced by 10 mM CaCl_2 or MgCl_2 solutions.

The conformation of PeRoL at different temperatures and pH values was evaluated by fluorometric analysis. The extrinsic fluorescence of the probe bis-ANS incubated with PeRoL was recorded using a FP-6300 spectrofluorometer (Jasco Corp., Japan). Lectin samples (1 μM) that were either not heated or heated at 100 °C (30 min) in distilled water as well as samples incubated for 24 h at pH 4.0 or 12.0 were incubated with 50-fold molar excess of bis-ANS. The fluorescence was evaluated using an exciting wavelength of 360 nm, and the emission spectra were recorded in the range from 400 to 600 nm.

2.6. Endogenous inhibitor investigation

Total carbohydrate content in the root extract was determined by the phenol-sulfuric acid method [24]. Reducing sugars were determined by the dinitrosalicylic acid method [25]. PeRoL HA was performed in presence of the root extract in order to evaluate the presence of an endogenous inhibitor. For this, an HA assay was performed as described in the previous section, replacing the NaCl solution by the root extract (5.1 mg/mL of protein and 9.8 mg/mL of carbohydrates).

The root extract (50 μL) was also incubated (60, 90, 120, 150 or 180 min at 37 °C) with 30 μL of 1.0 mg/mL trehalase from porcine kidney (Sigma-Aldrich, USA) in 50% (v/v) glycerol containing 1% (v/v) Triton X-100 and 25 mM potassium phosphate. After this, the HA from the treated extract was determined as previously described. A control assay was performed by incubating the root extract (50 μL) with the buffering solution without enzyme (30 μL) under the same conditions. Another control was performed by incubating the erythrocyte suspension (50 μL) with the enzyme solution (50 μL).

In addition, the concentration of trehalose in root extract after and before treatments with the enzyme was determined based on a curve established by high-performance liquid chromatography (HPLC) of this disaccharide at different concentrations. D-Trehalose (Sigma-Aldrich, USA) solutions (1.16–10.7 mg/mL) or root extract (untreated and treated with enzyme) was loaded (20 μL) onto an Aminex HPX-87H ion exclusion column (300 mm $\times$ 7.8 mm I.D., Bio-Rad, Hercules, CA, USA) coupled to a liquid chromatography system (Hewlett Packard Agilent Technologies—1200 Series) with a G1212A binary pump and a refractive-index detector G1362A detector (Agilent) at 210 nm. The mobile phase was composed by 5.0 mM sulfuric acid at a flow rate of 0.6 mL/min and the column temperature was maintained at 35 °C. The running time was 20 min.

2.7. Antimicrobial assay

Gram-positive (*Enterococcus faecalis* WDCM 00117, *Staphylococcus aureus* WDCM 00032) and Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025, *Escherichia coli* WDCM 00013) bacteria were provided by the *Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). Yeasts (*Candida albicans* URM-7098, *Candida tropicalis* URM-7092, *Candida krusei* URM-6391, *Candida pelliculosa* URM-6284 and *Candida parapsilosis* URM-7087) were provided by the collection University Recife Mycologia (URM) from the *Departamento de Micologia* of UFPE. The microorganisms were cultured in Nutrient Broth at 37 °C (bacteria) or Sabouraud-Dextrose at 28 °C (yeasts) for 16 h, under shaking. The culture concentrations were adjusted turbidimetrically (600 nm) to 10^6 colony-forming units (CFU) for use in assays to determine the minimal inhibitory (MIC), bactericidal (MBC) and fungicidal (MFC) concentrations.

In a 96-microplate row, the sample (PeRoL in 0.15 M NaCl; 80 μL) was two-fold serially diluted from the third well in the culture medium. In the first well, only 100 μL of the culture medium was added as a sterility control. In the second well, the culture medium diluted 1:1 with 0.15 M NaCl was added as a 100% growth control. Next, 20 μL of the microbial suspension was added to each well, and the optical density (OD)

at 600 nm was determined. After incubation at 37 °C (bacteria) or 28 °C (fungi) for 24 h, the OD was read again. The assays were performed in triplicate. The MIC corresponded to the lowest concentration of the sample that promoted a reduction greater than or equal to 50% in OD in comparison with the 100% growth control [26].

To determine the MBC or MFC, inoculations (10 μL) from wells corresponding to concentrations greater than or equal to the MIC were transferred to Nutrient Agar (bacteria) or Sabouraud Dextrose Agar (yeasts) plates, which were incubated at 37 °C or 28 °C for 24 h. The MBC or MFC corresponded to the lowest concentration able to reduce the viability of initial inoculum by 99.9%.

2.8. Cytotoxicity assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from heparinized blood from healthy and non-smoking donors ($n = 3$) who had not taken any drugs for at least 15 days before the sample collection. All donors signed an informed consent form, and the study was approved by the Human Research Ethics Committee of UFPE (process 1.285.288). The PBMCs were isolated using a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque. Cells were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used in the assays when viability was higher than 98%.

In each assay, the PBMCs (1×10^6 cells/mL) were plated in 96-well microtiter plates and, after 24 h, PeRoL (in 0.15 M NaCl) was added to different wells in order to obtain the concentrations 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$. After incubation (48 h at 37 °C), 100 μL of MTT solution (5.0 mg/mL) was added to each well, and the cell viability was determined by assessing the ability of the viable cells to reduce the yellow tetrazolium to a blue formazan product. After 3 h, the formazan was dissolved in 20% (w/v) SDS, and absorbance at 570 nm was measured using a multi-plate reader. The assays were performed in triplicate in three independent experiments.

2.9. Hemolytic assay

The assay was performed according to Braga et al. [27], with some modifications, in 96-well microplates. Each well received 100 μL of a 0.85% NaCl solution containing 10 mM CaCl_2 . A sample (100 μL) of PeRoL was added to the first well of a microplate row, from which 100 μL were transferred to the second well to perform a serial dilution (final concentrations ranging from 0.78 to 100 $\mu\text{g/mL}$ in saline solution). Next, 100 μL of a 2% (v/v) suspension of human erythrocytes in saline solution containing 10 mM CaCl_2 was added. In negative controls, 100 μL of saline solution plus 100 μL of erythrocyte suspension were plated. The positive control (to obtain 100% hemolysis) contained 80 μL of saline solution plus 20 μL of 0.1% Triton X-100 in saline. After centrifugation for 1 h followed by incubation for 1 h at 27 °C, the supernatant was discarded, and the released hemoglobin was measured by absorbance at 450 nm. Three independent experiments were performed in triplicate. The assay was approved by the Human Research Ethics Committee of UFPE (2.478.480).

2.10. Statistical analysis

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

3. Results and discussion

Root extract from *P. elatior* showed 5.13 mg/mL of proteins and a specific HA of 1.55. A low activity can be due to a low lectin concentration or the presence of endogenous molecules able to inhibit the

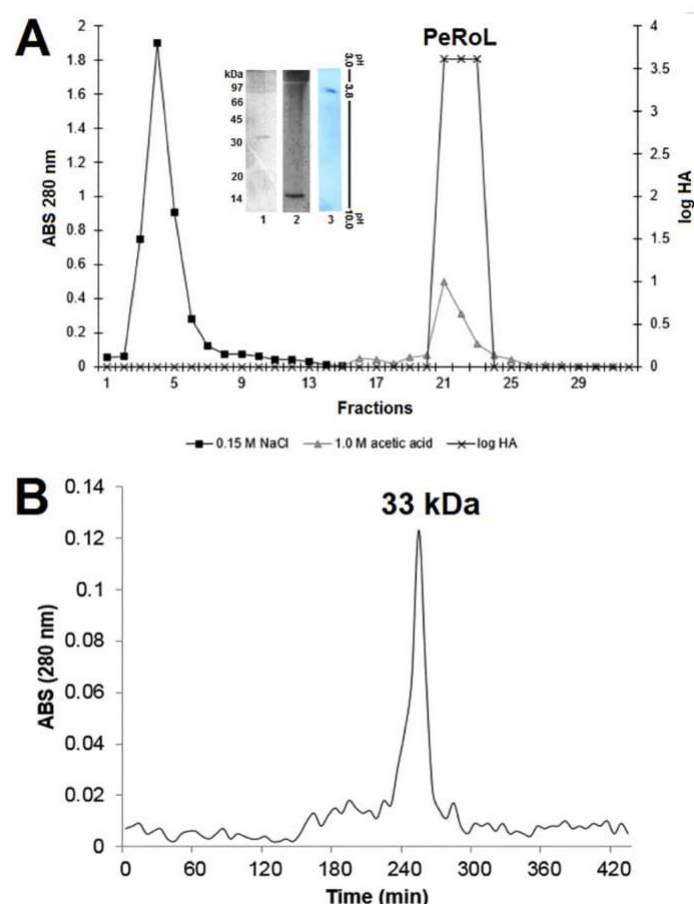


Fig. 1. Purification of *Portulaca elatior* root lectin (PeRoL). (A) Chromatography of root extract (10.3 mg of protein) onto a chitin column. The washing step used 0.15 M NaCl. PeRoL was eluted using 1.0 M acetic acid. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm and hemagglutinating activity (HA). The insets show the profile of PeRoL on SDS-PAGE (12%, w/v) under non-reducing (1) and reducing (2) conditions and on isoelectric focusing (3). The gels were stained with Coomassie Blue. (B) Gel filtration chromatography of PeRoL on a HiPrep Sephacryl S-100HR column coupled to AKTAPrime system. The relative molecular mass was calculated by comparison with the migration of molecular mass markers.

agglutinating ability of the lectins present in the extract. The root extract was chromatographed on a chitin column (Fig. 1A) to purify the lectin. The non-absorbed fractions did not show HA, while the pool of fractions eluted with 1.0 M acetic acid showed a specific HA of 34,133, resulting in a high purification factor (Table 1). This peak was determined to be PeRoL, and the remarkable increase of SHA is indicative of the presence of endogenous inhibitor(s) in the extract.

Gel filtration chromatography revealed a native molecular mass of ca. 33 kDa for PeRoL (Fig. 1B). Polypeptide bands of ca. 32 and 15 kDa were detected by SDS-PAGE of PeRoL under non-reducing and reducing conditions, respectively (Fig. 1A, insets 1 and 2). This result revealed that PeRoL is a dimeric protein with subunits linked by disulfide bridges. PeRoL showed an acidic nature as indicated by the isoelectric point of 3.8 (Fig. 1A, inset 3). Tryptic digestion of PeRoL resulted in peptides matches (Table 2) not assigned to Viridiplantae proteins in the database.

Table 1
Summary of the purification of *Portulaca elatior* root lectin (PeRoL).

Sample	Protein (mg/mL)	HA	SHA	Purification factor
Root extract	5.13 ± 0.51	8 ± 0.0	1.55	1.0
PeRoL	0.12 ± 0.06	4096 ± 0.0	34,133	22,021

HA: hemagglutinating activity. SHA: specific HA. Purification factor was calculated by the ratio between the SHA of the lectin and the SHA of the extract.

Table 2

Peptide matches and respective amino acid sequences from PeRoL after in gel digestion with trypsin.

Mr (Da)	Peptide sequence
839.4848	GIGFYKR
865.4722	AVASYAER
869.5472	VVAELSPR
898.5362	GVATVSLPR
912.5516	GLDGVSIPIR
930.4394	RMDGAEPRI
1030.5054	ASDVNLLSGR
1043.5094	MKGEYGTK + oxidation (M)
1089.5560	TGLIEWEDK
1089.5802	MEEMILHR + 2 oxidation (M)
1214.5942	AKGLDYVYMR
1235.7592	VVGKLGQILGPR
1238.6654	QAFQGQFSGGKR
1243.7212	ELPVVGTTGIFR
1264.6920	QKSFSPMVWR
1295.6948	AGITVFGFTLDR
1300.7442	LVALVRTYNPR
1313.7034	NVGTEFLSYR
1323.7410	RLGYEISAMIR + oxidation (M)
1327.6918	IPALCNLQPMR + oxidation (M)
1330.5872	IGDFLDYGFER
1331.7180	EIFEEMLLHR + oxidation (M)
1346.6824	SSSKTKPFRPGR
1352.7146	GFAKEIGFDITR
1420.7874	FPPKEVDYLWK
1465.6022	LGALMNETQASCR + oxidation (M)
1502.7818	TGGLTRGDILYLPK
1768.8526	HVDALEEAIGAKLFTR
1839.8974	SSSASKMLDPDIYAAIR + oxidation (M)
1896.9260	TTFENEVRGSLSPFASR

The HA inhibition assay using carbohydrates and glycoproteins was carried out to confirm that the agent responsible for agglutination is a lectin as well as to establish the carbohydrate specificity of the lectin [8]. Table 3 shows the results of the inhibition assay, evidencing that trehalose was the best inhibitor of PeRoL HA. Galactose, glucose, mannose and *N*-acetylglucosamine also inhibited the agglutination. Among the glycoproteins, the HA of PeRoL was mainly inhibited by thyroglobulin and fetuin. The polysaccharides chitosan, inulin, and xylan did not interfere with HA.

Some lectins are specialized in recognize only one type of sugar but other can be able to recognize monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides and polysaccharides; in this case, the affinity for each

Table 3
Hemagglutinating activity (HA) of PeRoL in presence of carbohydrates and glycoproteins.

Carbohydrates/glycoproteins	Specific HA of PeRoL
Monosaccharides (200 mM)	
Galactose (Gal)	8533 ± 0.0
Glucose (Glc)	8533 ± 0.0
Mannose (Man)	8533 ± 0.0
<i>N</i> -acetyl-glucosamine (GlcNAc)	17,066 ± 0.0
Ribose (Rib)	34,133 ± 0.0
Disaccharide (200 mM)	
Trehalose	266 ± 0.0
Polysaccharides (0.5 mg/mL)	
Chitosan	34,133 ± 0.0
Inulin	34,133 ± 0.0
Xylan	34,133 ± 0.0
Glycoproteins (0.5 mg/mL)	
Casein	17,066 ± 0.0
Fetuin	2133 ± 0.0
Ovalbumin	8533 ± 0.0
Thyroglobulin	533 ± 0.0

Specific HA of PeRoL in 0.15 M NaCl: 34,133. Trehalose: Glc(α1 → 1α)Glc. Chitosan: deacetylated chitin [α GlcNAc(β1 → 4)GlcNAc polymer]. Inulin: Fru(β2 → 1)Fru polymer with chain-terminating glucosyl moieties. Xylan: Xyl(β1 → 4)Xyl polymer plus 4-*O*-methyl glucuronic acid side chains. Fru: fructose. Xyl: xylose.

sugar type is different. Our data show that the carbohydrate-binding sites of PeRoL preferentially bind to monosaccharides and short sugar chains, probably due to geometric and steric issues. The fact that chitosan, inulin and xylan were not able to inhibit the HA of PeRoL demonstrates that this lectin had a higher affinity for the oligosaccharides present in the erythrocyte membrane than for these polysaccharides. However, it cannot be said that this lectin is unable to recognize long and complex chains of sugars since it was able to bind chitin.

Other trehalose-binding lectins showed sugar specificity similar to that of PeRoL. The lectins from *Canavalia virosa* seeds and salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants showed high specificity for mannose and trehalose and were also able to bind glycan moieties of fetuin and thyroglobulin [28,29]. The *C. virosa* lectin also had its HA inhibited by *N*-acetylglucosamine in an extension lower than trehalose. To our knowledge, there is no other report of a lectin with higher affinity for trehalose and that was also able to bind chitin. The reasons for this characteristic of PeRoL need to be clarified in future studies but it can be suggested that the adsorption to chitin matrix may be related with the fact that PeRoL HA was inhibited by *N*-acetylglucosamine.

The expressive purification factor of PeRoL could indicate that the chromatographic process was efficient to eliminate endogenous inhibitor(s) present in the root extract. Aiming to investigate this hypothesis, the effect of extract on PeRoL HA was determined. The root extract (containing 9.8 mg/mL of total carbohydrates and 1.5 mg/mL of reducing sugars) was able to reduce the HA of PeRoL from 4096 to 4. This datum revealed that the root extract probably contained carbohydrates able to occupy the PeRoL binding sites and prevent the interaction with erythrocytes. The extract was then subjected to HPLC, and the chromatographic profile was compared with that from trehalose, which was the best inhibitor of PeRoL HA. The retention time of the peak detected in the chromatographic profile of trehalose corresponded to that of the main peak of root extract; thus, this carbohydrate was probably an endogenous inhibitor of PeRoL HA.

In order to evaluate whether trehalose (the best inhibitor) would correspond to the endogenous inhibitor, the root extract was treated with trehalase before the HA assay. The HA of the extract increased from 8 to 256 (Fig. 2A). The erythrocytes incubated only with the enzyme (control 2) showed normal precipitation, indicating that the enzyme solution did not interfere with the assay. The trehalose concentration in the extract progressively decreased from 8.05 (no treatment) to 6.4 mg/mL during the 180-min treatment with the enzyme (Fig. 2B).

Protein structure is influenced by environmental factors, such as pH and temperature. The HA and conformational stability of PeRoL was investigated after incubation at different temperatures and pH values. The thermal stability assay indicated that PeRoL HA was resistant to heating even at 121 °C for 30 min (Fig. 3A). This result can be linked to the presence of disulfide bonds similar to those reported for other heat-stable

plant lectins, such as those isolated from seeds of *Apuleia leiocarpa*, *Bauhinia forficata* and *Moringa oleifera* seeds [30–32]. Conformational changes were investigated using the bis-ANS probe that binds to hydrophobic pockets and emits fluorescence only when protected from a water environment. The bis-ANS fluorescence emission was higher in lectin heated at 100 °C, in comparison with unheated protein, and the maximum emission wavelength was slightly shifted after heating (Fig. 3B). This result reveals the presence of hydrophobic clusters in PeRoL, suggest that heating may have led to higher closure of the protein structures, and shows that heating did not result in denaturation accompanied by unfolding.

Fig. 3C shows that PeRoL HA was stable in acidic and slightly alkaline (pH 4.0–8.0) media, but the lectin was inactive in the alkaline pH range (9.0–12.0). The bis-ANS fluorescence in presence of PeRoL was about three times lower in acidic environment than in alkaline medium, although there was no shift of the maximum wavelength (Fig. 3D). These data reveal that the absence of HA at pH 12.0 was not associated with PeRoL unfolding while the higher exposure of hydrophobic pockets to water at pH 5.0 was not a factor that prevented the ability of PeRoL to bind carbohydrates from the erythrocyte surface. Both the activity and stability of macromolecules may be affected by pH changes. However, the pH for maximum stability may not be the same as that for maximum activity since only pH for activity is under evolutionary pressure [33]. The assays in presence of divalent cations showed that Ca^{2+} and Mn^{2+} did not affect the PeRoL HA.

PeRoL showed bacteriostatic activity against *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, but it did not inhibit the growth of *Escherichia coli* (Table 4). Bactericidal effect was not detected. Bacteriostatic agents may act through inhibition of cell wall synthesis, cell membrane function, protein synthesis, and nucleic acid synthesis [34]. All of these events may be triggered by lectin binding to glycosylated receptors at the bacterial surface.

The lectin showed fungicidal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* (Table 4). PeRoL was more efficient than the lectins from *Archidendron jiringa* seeds (MIC: 56.7 µg/mL) and *Curcuma longa* rhizome (MIC: 46 µg/mL) [35,36]. Studies suggest that lectins can act on the surface of the cell wall of fungi, changing its structure and its permeability [17,37]. The lectin from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae promoted alterations in cell morphology and damage to cell wall of *Candida krusei* [38]. The lectin from *Punica granatum* sarcotesta showed antifungal activity on *Candida albicans* and *Candida krusei* by inducing oxidative stress and energetic collapse as well as damaging the cell wall [12]. In addition, a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds increased the cell membrane permeabilization and reactive oxygen species production in *C. albicans* [39].

PeRoL did not affect PBMCs viability at the tested concentrations of 10 and 100 µg/mL (Fig. 4A). This result is similar to that for the lectins isolated from *C. surinamensis* leaf pinnulae [38] and the *Microgramma*

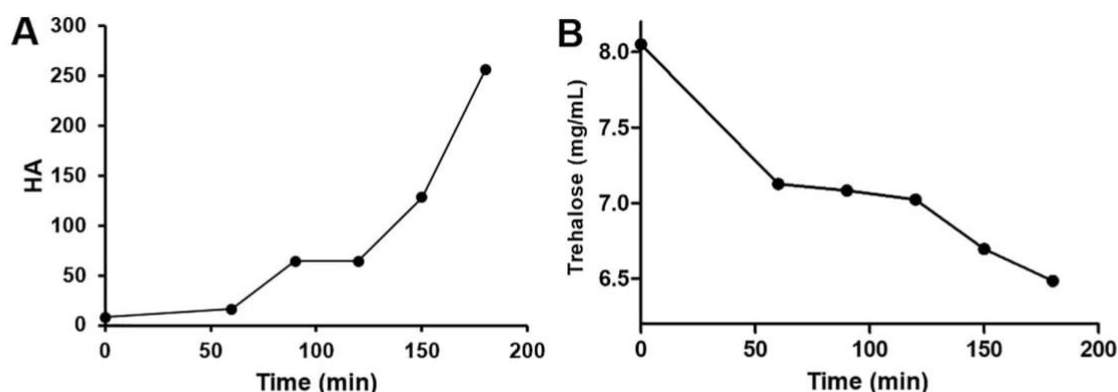


Fig. 2. Investigation of endogenous inhibitor in *P. elatior* root extract. Hemagglutinating activity, HA (A), and trehalose concentration (B) of root extract were determined before and after treatment with trehalase for different periods (60, 90, 120, 150 and 180 min).

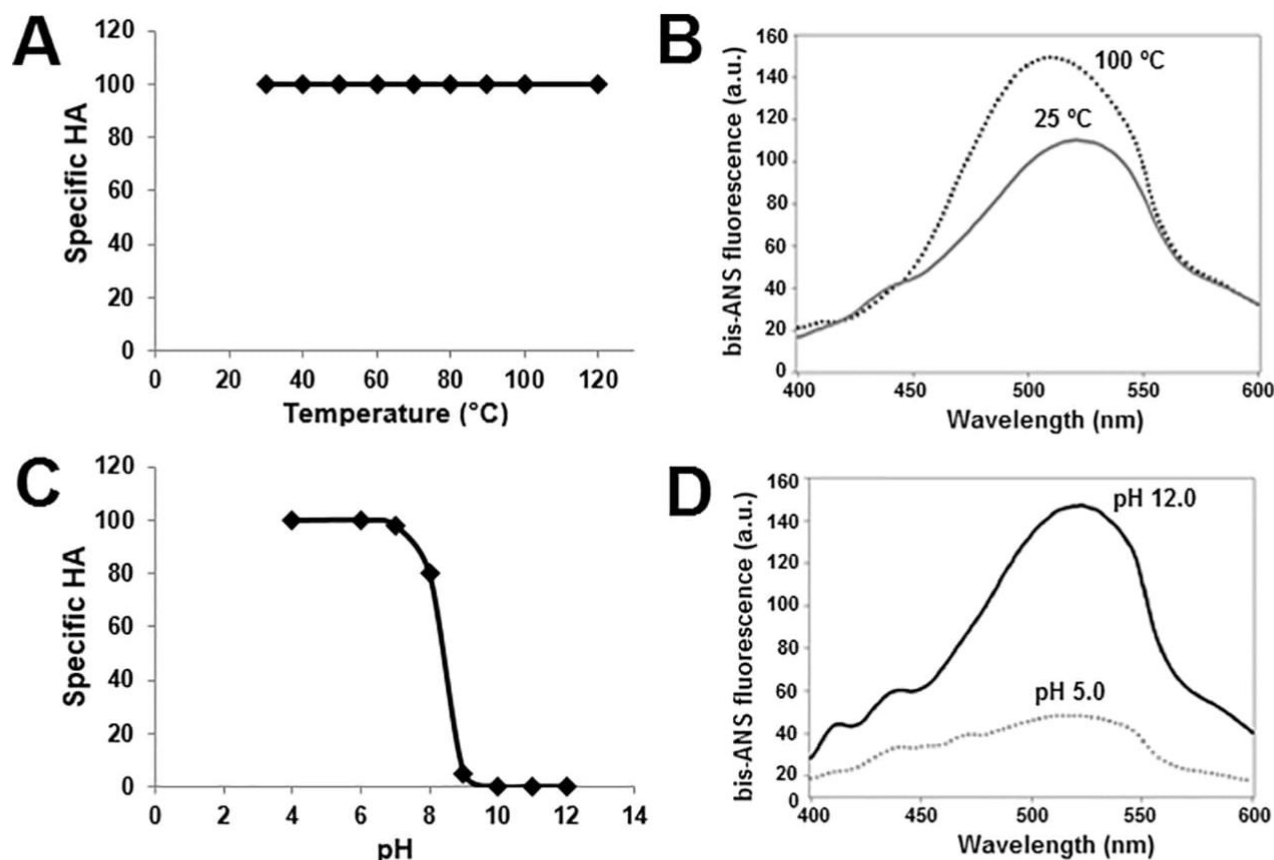


Fig. 3. Effects of heating (A and B) and incubation at different pH values (C and D) on PeRoL hemagglutinating activity, HA (A and C), and conformation (B and D) of PeRoL. Conformational changes were investigated by monitoring the fluorescence spectra of the probe bis-ANS in presence of the lectin samples.

vacciniifolia rhizome lectin [40]. The toxicity of PeRoL was also investigated by hemolytic assay using human erythrocytes. Maximum percentage of hemolysis caused by PeRoL was $5.18 \pm 0.73\%$ (Fig. 4B), which indicates low hemolytic activity [27].

4. Conclusion

The roots of *P. elatior* contain a thermostable and acidic lectin with bacteriostatic, fungistatic, and fungicidal properties against human pathogens and no cytotoxic or hemolytic activity against human healthy cells.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for

Table 4

Antimicrobial activity of *Portulaca elatior* root lectin (PeRoL).

Microorganism	PeRoL (μg/mL)	
	MIC	MBC/MFC
Bacteria		
<i>Enterococcus faecalis</i>	8.12	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.06	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	32.5	ND
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND
Fungi		
<i>Candida albicans</i>	16.0	16.0
<i>Candida parapsilosis</i>	16.0	16.0
<i>Candida krusei</i>	16.0	16.0
<i>Candida tropicalis</i>	16.0	16.0

MIC: minimal inhibitory concentration. MBC: minimal bactericidal concentration. MFC: minimal fungicidal concentration. ND: not detected.

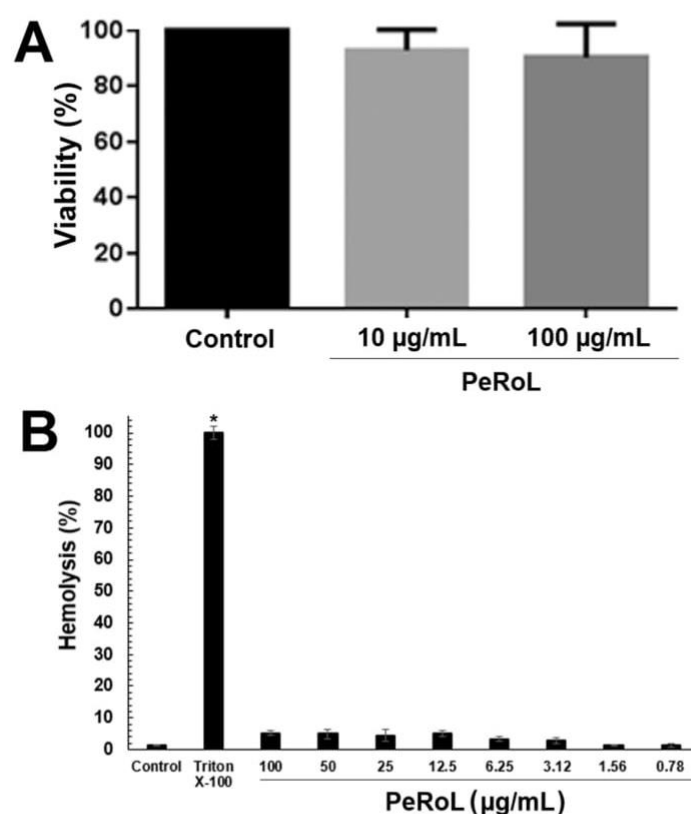


Fig. 4. Evaluation of cytotoxicity (A) and hemolytic activity (B) of PeRoL on human peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes, respectively.

research grants and fellowships (THN and PMGP) as well as to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; Financial Code 001) and *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. The authors also thank Carlos Eduardo Sales da Silva for technical assistance.

References

- [1] K. Banda, A. Delgado-Salinas, K.G. Dexter, R. Linares-Palomino, A. Oliveira-Filho, et al., Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications, *Science* 353 (2016) 1383–1387.
- [2] J.M.C. Silva, I.R. Leal, M. Tabarelli, Caatinga - The Largest Tropical Dry Forest Region in South America, Springer International Publishing, 2017.
- [3] 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 semiarid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 327–335.
- [4] R. Radhakrishnan, M.N.M. Zakaria, M.W. Islam, H.B. Chen, M. Kamil, K. Chan, A. Al-Attas, Neuropharmacological actions of *Portulaca oleracea* L. v. *sativa* (Hawk), *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 171–176.
- [5] I. Oliveira, P. Valentão, R. Lopes, P.B. Andrade, A. Bento, J.A. Pereira, Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems, *Microchem. J.* 92 (2009) 129–134.
- [6] M.K. Uddin, A.S. Juraimi, M.S. Hossain, M.A.U. Nahar, M.E. Ali, M.M. Rahman, Purslane Weed (*Portulaca oleracea*): a prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes, *Sci. World J.* 2014 (2014) 951019.
- [7] A.A.O.P. Coelho, A.M. Giulietti, O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil, *Acta Bot. Bras.* 24 (2010) 655–670.
- [8] L.C.B.B. Coelho, P.M.S. Silva, V.L.M. Lima, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017 (2017) 1594074.
- [9] T.F. Procópio, M.C. Moura, L.P. Albuquerque, F.S. Gomes, N.D.L. Santos, L.C.B.B. Coelho, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential, *Antibacterials - Synthesis, Properties and Biological Activities*, Nova Science Publishers, Inc., New York 2017, pp. 69–89.
- [10] M.L.R. Macedo, C.F.R. Oliveira, C.T. Oliveira, Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection, *Molecules* 20 (2015) 2014–2033.
- [11] J.K.L. Campos, C.S.F. Araújo, T.F. Araújo, A.F.S. Santos, J.A. Teixeira, V.L.M. Lima, L.C.B.B. Coelho, Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin, *Biochim. Open* 2 (2016) 62–68.
- [12] P.M. Silva, M.C. Moura, F.S. Gomes, D.S. Trentin, A.P.S. Oliveira, G.S.V. Mello, M.G.R. Pitta, M.J.B.M. Rego, L.C.B.B. Coelho, A.J. Macedo, R.C.B.Q. Figueiredo, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, PgTel, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 391–400.
- [13] T. Yau, X. Dan, C.C.W. Ng, T.B. Ng, Lectins with potential for anti-cancer therapy, *Molecules* 20 (2015) 3791–3810.
- [14] S. Ratanapo, W. Ngamjunyaporn, M. Chulavatnatol, Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*, *Plant Sci.* 160 (2001) 739–744.
- [15] M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? in: Y.H. Siddique (Ed.), *Recent Trends in Toxicology*, vol. 37, Transworld Research Network, Kerala 2008, pp. 47–59.
- [16] L.C.B.B. Coelho, P.M.S. Silva, W.F. Oliveira, M.C. Moura, E.V. Pontual, F.S. Gomes, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, Lectins as antimicrobial agents, *J. Appl. Microbiol.* (2018) <https://doi.org/10.1111/jam.14055>.
- [17] Sze Kwan Lam, Tzi Bun Ng, Lectins: production and practical applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 45–55.
- [18] 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: Epidemiology, Environmental Sources and Prevention*, Nova Science Publishers Inc., New York 2012, pp. 161–175.
- [19] 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.
- [20] P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36 (1992) 113–118.
- [21] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1966) 1166–1170.
- [22] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [23] T.A. Lima, L.P. Dornelles, A.P.S. Oliveira, C.C.S. Guedes, S.O. Souza, R.A. Sá, R.B. Zingali, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva* in the gut of *Nasutitermes corniger* workers, *Pest Manag. Sci.* 74 (2018) 1593–1599.
- [24] T. Masuko, A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S.-I. Nishimura, Y.C. Lee, Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format, *Anal. Biochem.* 339 (2005) 69–72.
- [25] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [26] D. Amsterdam, Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, in: V. Lorian (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams and Wilkins, Baltimore 1996, pp. 52–111.
- [27] A.A. Braga, R.R. Lacerda, G.K.V.V. Medeiros, G.F. Gonçalves, H.L.F. Pessoa, J.D. Cardoso, C.A.A. Gadelha, B.A. Silva, T. Santi-Gadelha, Antibacterial and hemolytic activity of a new lectin purified from the seeds of *Sterculia foetida* L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175 (2015) 1689–1699.
- [28] S. Shanmugavel, V. Velayutham, T. Kamalanathan, M. Periasamy, A. Munusamy, J. Sundaram, Isolation and analysis of mannose/trehalose/maltose specific lectin from jack bean with antibruchid activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 1–14.
- [29] W. Zhang, W.J. Peumans, A. Barre, C.H. Astoul, P. Rovira, P. Rougé, P. Proost, P. Truffa-Bachi, A.A.H. Jalali, E.J.M. Van Damme, Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants, *Planta* 210 (2000) 970–978.
- [30] A.F.S. Santos, L.A. Luz, A.C.C. Argolo, J.A. Teixeira, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectina, *Process Biochem.* 44 (2009) 504–508.
- [31] M.C.C. Silva, L.A. Santana, R. Mentale, R.S. Ferreira, A. Miranda, R.A. Silva-Lucca, M.U. Sampaio, M.T.S. Correia, M.L.V. Oliva, Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds, *Process Biochem.* 47 (2012) 1049–1059.
- [32] A.S. Carvalho, M.V. Silva, F.S. Gomes, P.M.G. Paiva, C.B. Malafaia, T.D. Silva, A.F.M. Vaz, A.G. Silva, I.R.S. Arruda, T.H. Napoleão, M.G. Carneiro-da-Cunha, M.T.S. Correia, Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds, *Int. J. Biol. Macromol.* 75 (2015) 402–408.
- [33] K. Talley, E. Alexov, On the pH-optimum of activity and stability of proteins, *Proteins* 78 (2020) 2699–2706.
- [34] M. Rezaei, M. Komijani, S.M. Javadi, Bacteriostatic agents, in: V. Bobbarala (Ed.), *A Search for Antibacterial Agents*, IntechOpen, Rijeka 2012, pp. 219–234.
- [35] P. Petnual, P. Sangvanich, A. Karnchanat, A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial, and α -glucosidase inhibitory activities, *Food Sci. Biotechnol.* 19 (2010) 907–916.
- [36] S. Charungchitrak, A. Petsom, P. Sangvanich, A. Karnchanat, Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen, *Food Chem.* 126 (2011) 1025–1032.
- [37] A.P.A. Boleti, M.G.M. Freire, M.B. Coelho, W. Silva, P.A. Baldasso, V.M. Gomes, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L.R. Macedo, Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2653–2658.
- [38] 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.
- [39] J.X.S. Neto, M.L. Pereira, J.T.A. Oliveira, L.C.B. Rocha-Bezerra, T.D.P. Lopes, H.P.S. Costa, D.O.B. Sousa, B.A.M. Rocha, T.B. Grangeiro, J.E.C. Freire, A.C.O. Monteiro-Moreira, M.D.P. Lobo, R.S.N. Brilhante, I.M. Vasconcelos, A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 980.
- [40] L.P. Albuquerque, E.V. Pontual, G.M.S. Santana, L.R.S. Silva, J.S. Aguiar, L.C.B.B. Coelho, M.J.B.M. Rêgo, M.G.R. Pitta, T.G. Silva, A.M.M.A. Melo, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*, *Acta Trop.* 138 (2014) 23–27.