

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DE UMA LECTINA
PRESENTE NAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* VOGEL E O
ANTIBIÓTICO GENTAMICINA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Chapadinha – MA

2019

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DE UMA LECTINA
PRESENTE NAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* VOGEL E O
ANTIBIÓTICO GENTAMICINA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Trabalho de Trabalho de
Conclusão de Curso (TCC)
apresentado à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do
Maranhão, Centro de Ciências
Agrárias e Ambientais, como
requisito para obtenção de grau de
Licenciatura em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Claudener
Souza Teixeira.

Chapadinha - MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Santos, Maria Helena Cruz dos.

Estudo da interação e efeito modulador de uma lectina presente nas sementes de *Machaerium acutifolium* Vogel e o antibiótico gentamicina em bactérias multirresistentes / Maria Helena Cruz dos Santos. - 2019.

47 p.

Orientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2019.

1. Aminoglicosídeo. 2. MaL. 3. Purificação. 4. Sinergismo.
5. Tolerância. I. Teixeira, Claudener Souza.
II. Título.

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DE UMA LECTINA
PRESENTE NAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* VOGEL E O
ANTIBIÓTICO GENTAMICINA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Monografia apresentada à coordenação de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, como requisito para obtenção de grau de licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 09/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

MSc. Karla Lílian Rodrigues Batista (Examinadora)

Romério Rodrigues dos Santos Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Chapadinha - MA

2019

*A minha mãe, mulher guerreira, que
nunca mediu esforços para com seus
filhos e que me apoia mesmo nas
adversidades do meu ser, com seu
amor infinito.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A princípio a Deus, este como uma energia contida em milhares de partículas dispersas de maneira coordenada presente em cada canto do Universo, agradeço esta, por ter me dado motivos para continuar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira um ser iluminado de destreza e sabedoria, por cada conhecimento transmitido, agradeço por não ter desistido de mim, o senhor é fonte de inspiração no meio acadêmico, sua orientação foi essencial para meu desenvolvimento na área da ciência.

A minha família que sempre me apóia, em especial a minha mãe Elizângela, minha irmã Emanuelle e meu irmão Rafael, minha tia Eliane e meu vô e vó José Façanha e Francisca, respectivamente, a minha prima Mayara e mesmo distante ao meu irmão Osias Neto, vocês são o meu motivo.

Ao LaBEM, que foi uma parte muito importante da minha trajetória, assim como todos os componentes do mesmo, que convivi. Pelo auxílio de Karla e Renato, a Évelyn e Sheylla amigas que fiz ao decorrer do tempo, ao Rafael e suas histórias, ao Romério um ser de luz e sua ajuda de diversas formas, Ana Larissa minha companheira que entramos e sairemos juntas, por cada momento de incentivo e positividade, uma pessoa de luz, uma fada! A Valdenice que me ajudou de forma intensa, agradeço muito, um anjo de luz que assim como todos, tem um futuro maravilhoso a espera. A Ana Lúcia, uma amiga de verdade que fiz durante a graduação, me ajudou em todos os momentos possíveis e impossíveis, minha graduação é imensa. E aos coelhos, Helena, Matheus e coelho vulgo Leia/Yoda, agradeço por cada eritrócito.

As “Bakas”, Marina Ângela, Laryssa, Hyanka e Sarah Shelda que sempre estão presente me dando forças, em qualquer momento da minha vida.

Aos meus amigos que fiz no decorrer desta graduação, em especial à Auricelia, Justiane, Valquíria, Jonnys Leydes, Dávila, Marcos, e todos aqueles que de alguma forma me acrescentaram e vice-versa.

Por fim, agradeço ao Laboratório de Produtos de Origem Animal – LAPOA e à Professora Michele. Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM da Universidade Regional do Cariri – URCA. Ao Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias do Centro de Ensino Unificado do Maranhão – CEUMA, na pessoa do professor Luís Cláudio.

*“Exausta, a pobre Lesma da
vanlória, ao atingir o cume do
obelisco, disse, olhando da própria
baba o risco: Meu rastro ficará
também na História!”*

Trilussa

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde nomeou a resistência bacteriana aos antibióticos como uma das mais importantes ameaças à saúde pública do século XXI, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias, a fim de mitigar esta problemática. Visando isso, estudos revelam uma classe de proteínas que reconhecem e interagem com carboidratos específicos chamadas lectinas, em associação com antibióticos têm se mostrado uma alternativa no tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes, visto que essa combinação é capaz de aumentar o efeito antibacteriano de aminoglicosídeos. Este estudo teve como objetivo analisar a interação e a capacidade da lectina das sementes de *Machaerium acutifolium* (MaL) em modular a atividade antibiótica da gentamicina em bactérias multiresistentes. A lectina foi purificada a partir da precipitação por sulfato de amônio na fração 0-60 % seguido de dois passos cromatográficos, em coluna de manose-agarose e posterior cromatografia de troca iônica. A lectina purificada foi utilizada nos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante e ensaios biológicos. O estudo de inibição da atividade hemaglutinante, revelou que a gentamicina foi capaz de inibir a atividade da MaL em uma concentração inibitória mínima (CIM) de 12,5 mM. A CIM para a atividade antibacteriana obtida para a MaL contra todas as cepas estudadas não foi clinicamente relevante (CIM \geq 1,024 $\mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, quando a MaL foi combinada com a gentamicina, foi observado um aumento significativo na ação antibiótica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A MaL também reduziu o perfil de tolerância a antibióticos em *S. aureus* durante 10 dias de tratamento contínuo. Em conclusão observou-se que a lectina das sementes de *M. acutifolium* em sinergismo com o antibiótico gentamicina apresentou ação potencializadora contra bactérias de *S. aureus* e *E. coli*, além de reduzir significativamente o perfil de tolerância de *S. aureus* frente à gentamicina.

Palavras-chave: Aminoglicosídeo. MaL. Purificação. Sinergismo. Tolerância.

ABSTRACT

The World Health Organization has named the resistance bacterial to antibiotics as one of the most important threats to public health of the century XXI, making it necessary to develop new strategies, in order to mitigate this problem. In order, that studies show that a class of proteins that recognizes and interact with specific carbohydrates called lectins, in association with antibiotics have shown of an alternative in treatment of infections caused by pathogens multiresistant, as this combination is capable of enhancing the antibacterial effect of aminoglycosides. This study aimed to analyze the interaction and lectin capacity of *Machaerium acutifolium* (MaL) seeds to modulate gentamicin antibiotic activity in multiresistant bacteria. The lectin was purified from ammonium sulfate precipitation at 0-60% fraction followed by two chromatographic steps in column mannose-agarose and subsequent ion exchange chromatography. The lectin purified was used in hemagglutinating activity inhibition assays and biological assays. The study of the inhibition of the activity hemagglutinating, showed that gentamicin was able to inhibit the activity of MAL in one minimum inhibitory concentration (MIC) of 12,5 mM. The MIC for the antibacterial activity obtained for MaL against all strains studied was not clinically relevant (MIC \geq 1,024 $\mu\text{g mL}^{-1}$). However, when the MaL was combined with the gentamicin was a significant increase in antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The MaL also reduced profile of tolerance to antibiotics in *S. aureus* for 10 days of continuous treatment. In conclusion, it was observed that the lectin of *M. acutifolium* seeds in synergism with the gentamicin antibiotic showed potentiating action against *S. aureus* and *E. coli* bacteria, besides significantly reducing the tolerance profile of *S. aureus* against gentamicin.

Key-words: Aminoglycosides. MaL. Purification. Synergism. Tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil da eluição da cromatografia em agarose-manose.....	31
Figura 2 - Perfil da eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE.....	32
Figura 3 - Perfil SDS-PAGE.....	33
Figura 4 - Modulação da atividade antibiótica da gentamicina complexada com a MaL.....	35
Figura 5 - Efeito da MaL na inibição da tolerância à gentamicina por <i>S. aureus</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fonte bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.....	29
Tabela 2 - Efeito inibitório de monossacarídeos e gentamicina da atividade hemaglutinante da MaL.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJL-1	Lectina de <i>Anguilla japonica</i>
AMEs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
APG II	Angiosperm Phylogeny Group II
ARGs	Genes de resistência antimicrobiana
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CIM	Concentração inibitória mínima
CLF1	Lupano triterpeno 3β , 6β , 16β -trihidroxylup-20 (29) -eno
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
cm	Centímetros
Con A	<i>Concanavalina A</i>
DEAE	Dietilaminoetil celulose
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
g	Gravitacional
h	Horas
HGT	Transferência horizontal de genes
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
m	Massa
MaL	Lectina de <i>Machaerium acutifolium</i>
mg	Miligramas
mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitros
Min	Minutos
mL	Mililitros
mL min ⁻¹	Mililitros por minutos
MurNAc	Ácido <i>N</i> -acetilmurâmico
nm	Nanômetros
NI	Não inibiu
PI	Pico I
PII	Pico II
PAGE	Eletroforese em gel e poliacrilamida
PELa	Lectina de <i>Platypodium elegans</i>

pH	Potencial hidrogeniôco
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PFL	Lectina de <i>Platymiscium floribundum</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PPL	Lectina de <i>Parkia platycephala</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
U.H.	Unidade de hemaglutinação
v	Volume
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
μL	Microlitros
μG	Microgramas

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
\pm	Mais-menos
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor
\geq	Maior ou igual
μ	Micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Aspectos históricos do desenvolvimento dos antibióticos	17
2.2 Resistência e modulação bacteriana aos antimicrobianos	19
2.3 Gentamicina.....	21
2.4 Aspectos histórico, estruturais e de classificação das lectinas	22
2.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas.....	24
2.6 Lectinas de plantas	25
2.7 Características da espécie <i>Machaerium acutifolium</i> Vogel.....	26
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Coleta e identificação das amostras.....	27
4.2 Purificação da lectina	27
4.3 Caracterização da interação lectina-gentamicina	28
4.4 Ensaio biológico.....	28
4.4.1 Reagentes e drogas	28
4.4.2 Cepas bacterianas	28
4.4.3 Preparação e padronização do inoculo	29
4.4.4 Teste de Concentração Inibitória Mínima	29
4.4.5 Efeito modulador da atividade antibiótica	30
4.4.6 Perfil da tolerância bacteriana à gentamicina	30
4.5 Análises estatísticas.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Purificação da lectina de <i>M. acutifolium</i> (MaL).....	31
5.2 Estudo da interação MaL-gentamicina.....	33
5.3 Estudo da atividade antibacteriana	34
5.4 Estudo da modulação da atividade antibiótica	34
5.5 Avaliação da tolerância bacteriana à gentamicina.....	36
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde nomeou a resistência à antibióticos como uma das mais importantes ameaças à saúde pública do século XXI (WHO, 2014). A cada ano aumenta o uso indiscriminado e excessivo de antibióticos, o que leva ao aumento da resistência bacteriana, através do desenvolvimento de cepas multirresistentes. Toda essa "resistência à antibióticos pandêmicos" acarreta o aumento na taxa de mortalidade por infecções (KHAN; BAIG; MEHBOOB; 2017).

O surgimento de cepas resistentes como *Staphylococcus aureus* à uma ampla variedade de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, sulfonamidas e tetraciclina, tornou-se um problema pandêmico devido à opções terapêuticas limitadas (SCHITO, 2006).

No que diz respeito a crescente importância dada a infecções bacterianas em comunidades hospitalares e para o desenvolvimento progressivo da resistência antimicrobiana, muitos trabalhos têm demonstrado que combinações múltiplas de drogas sintéticas estão sendo utilizadas na tentativa de combater à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Trabalhos indicam ainda que, diferentes combinações antibióticas testadas in vitro e aplicadas na clínica, são comuns, como acontece na combinação de penicilina com a gentamicina. Tal combinação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal, resultando na modificação do efeito dos antibióticos, gerando respostas sinérgicas capazes de aumentar a atividade antibiótica ou até mesmo reverter o quadro da resistência (COUTINHO et al., 2008; GIBBONS, 2004).

Com o aumento global das infecções resistentes aos antibióticos, novas moléculas com atividade antimicrobiana estão sendo desenvolvidas (SILVA; AQUINO, 2018). Além disso, a busca por biomoléculas que possam modular mecanismos de resposta imune é atraente para o ajuste das condições imunológicas e aplicações terapêuticas em diversos processos relacionados à resposta às doenças e infecções (MAJEE; BISWAS, 2013). Entre as mais diversas moléculas de origem natural com potencial em modular a ação de antibióticos, podemos citar, os óleos essenciais (COUTINHO et al., 2017), secreções glandulares de anfíbios (SALES, et al., 2017), extratos de macroalgas (CORDEIRO et al., 2018) e proteínas de plantas (SANTOS, A. et al., 2019).

Dentre as diversas proteínas de plantas, destacam-se as lectinas, que são proteínas de origem não imune que possuem a destreza de reconhecer e ligar-se

reversivelmente a moléculas de carboidratos específicos, além de serem capazes de modular respostas celulares distintas (LAM; NG, 2010). Lectinas apresentam atividades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antitumorais, hipotensivas, inseticidas, antivirais, antifúngicas e antibacterianas (PAIVA, 2013).

Destacando-se ainda o potencial das lectinas extraídas de plantas do cerrado maranhense, entre as quais algumas são ligantes à glicose e manose que, em associação à antibióticos apresentam atividade sinérgica aumentando o efeito dos antimicrobianos contra bactérias multirresistentes (SANTOS, V. et al., 2019a; SANTOS, V. et al., 2019b; SILVA et al., 2019).

Lectinas do gênero *Machaerium* em geral possuem ligação aos carboidratos glicose e manose e apresentam atividades biológicas já descritas, tais como, atividade antinociceptiva (SANTOS, A. et al., 2019), anti-inflamatória (LOPES, 2013), antimalárica, antibacteriana (MUHAMMAD et al., 2001; MUHAMMAD et al., 2003).

Como as lectinas possuem a capacidade de interagir com glicanos de superfícies celulares, propõe-se que ocorram interações entre a lectina e o antimicrobiano gentamicina da classe dos aminoglicosídeos devido ao fato de a estrutura do antibiótico supracitado possuir glicanos passíveis de interação, possibilitando um efeito sinérgico entre essas moléculas potencializando a ação deste antimicrobiano contra cepas multirresistentes.

Objetiva-se com este trabalho, avaliar a interação e efeito modulador da lectina presente nas sementes de *Machaerium acutifolium* com o antibiótico gentamicina a partir de ensaios realizados com linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos históricos do desenvolvimento dos antibióticos

No período de 1857 a 1914, avanços rápidos, liderados principalmente por Pasteur e Robert Koch, levaram ao estabelecimento da microbiologia como uma ciência. As descobertas durante esses anos incluíram tanto os agentes de muitas doenças como o papel da imunidade na prevenção e na cura das doenças (TORTORA, 2012).

As pesquisas ainda nesse período eram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica. Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, devido ao uso de substâncias químicas contra infecções, foi responsável

pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir na proliferação de micro-organismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro, com isso, em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética (PATRIK, 1995; 2005).

Em 1928, no laboratório do St. Mary's Hospital, em Londres, durante os estudos com uma cultura de bactérias do gênero *Staphylococcus*, o médico e professor de bacteriologia Alexander Fleming observou a presença de um bolor contaminando uma de suas culturas, o qual havia provocado a morte dessas bactérias (GOODMAN; GILMAN, 2010). Visto isso, Fleming, indeliberadamente descobriu um antibiótico, que inibiu o crescimento das bactérias adjacentes pelo fungo *Penicillium notatum*, sendo mais tarde chamado de *Penicillium chrysogenum*, que ficou conhecido como, penicilina; depois das descobertas iniciais dos antibióticos, outros foram desenvolvidos (TORTORA, 2012).

Em 1935, foi criado por Gerhard Domagk um medicamento antibacteriano sintético, Prontosil, cujo ingrediente ativo é sulfanilamida que foi posteriormente identificado por Daniel Bovet, do Instituto Pasteur. E em 1939, René Dubos no laboratório de Oswald Avery no Rockefeller Institute for Medical Pesquisa em Nova York identificou tirotricina (uma mistura de antibióticos peptídicos tirocidina e gramicidina D) de bactérias do solo, sendo amplamente considerado o primeiro antibiótico a ser estabelecido como substância terapêutica (FERNANDES, 2006).

Após ser introduzida a penicilina como agente terapêutico em 1940, houve um aumento significativo na descoberta de novos medicamentos em consequência da segunda guerra mundial (PROJAN; SHLAES, 2004).

Nos anos de 1940 e 1960 houve a descoberta de diversos antibióticos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias gram-positivo, tais como, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, peptídeos, macrolídeos entre outros. Já nas décadas de 1960 a 1970, o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos e sua disseminação no ambiente hospitalar acrescentou urgência para procurar novos compostos antibióticos (FERNANDES, 2006).

A genômica e as triagens de coleções de compostos de produtos naturais microbianos foram as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos em 1980 a 2000. Porém, houve uma redução drástica na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na

incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

2.2 Resistência e modulação bacteriana aos antimicrobianos

A influência da resistência aos antibióticos na saúde e bem-estar humano e animal, bem como suas consequências econômicas, reforçou a necessidade de um esforço em rastrear e controlar seu surgimento e disseminação (WHO, 2014; KESSELHEIM; OUTTERSON, 2010). A história mostrou que a introdução de um novo antibiótico é frequentemente seguida pelo desenvolvimento de resistência bacteriana, devido à administração de altas doses de antibióticos de amplo espectro em resposta à infecção, fornecendo assim o potencial para a seleção de cepas resistentes (WHO, 2001).

O amplo uso de antibióticos em sistemas comerciais de produção de animais resultou na geração e disseminação de genes de resistência antimicrobiana (ARGs) (MODI; COLLINS; RELMAN, 2014; DAVIES; DAVIES, 2010). Existem várias razões subjacentes a esse fenômeno, como o uso de antimicrobiano ser o principal fator de resistência e, paradoxalmente, essa pressão seletiva vem de uma combinação de uso excessivo em muitas partes do mundo, uso incorreto devido à falta de acesso ao tratamento adequado e falha na conclusão dos cursos de tratamento (WHO, 2001), as características microbianas inerentes também desempenham um papel - por exemplo, a resistência de *S. aureus* à penicilina é altamente prevalente e, no entanto, as cepas de *Streptococcus pyogenes* são uniformemente sensível à penicilina, que continua sendo a droga de escolha no tratamento de infecções causadas por esse organismo (MARCHESE et al., 2000), as características sociais e tecnológicas também contribuem para a disseminação da resistência a antibióticos devido a aumentos substanciais na disponibilidade e facilidade de viagem dentro e entre países (LOWY, 2003).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência aos antibióticos por meio de mutações nos genes cromossômicos e por transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a um antibiótico específico é a capacidade de resistir à ação desse antibiótico como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes (BLAIR et al., 2015).

Mutações genéticas, por exemplo, podem ser induzidas por competição inter ou intraespécies, pressão antibiótica exógena e reconhecimento e resposta imunes. Além

disso, os genes de resistência a antibióticos podem ser adquiridos por recombinação genética por transferência horizontal de genes (HGT), conjugação, transdução de fago ou transformação (MODI; COLLINS; RELMAN, 2014; DAVIES; DAVIES, 2010).

O surgimento de resistência aos antimicrobianos parece ter seduzido o ritmo em que descobertas e desenvolvimento de melhores tratamentos antibióticos são feitos e, à medida que avançamos novas abordagens para substituir e complementar terapias com antibióticos são necessárias (JONES et al., 2017). Visto isso, trabalhos têm demonstrado que combinações múltiplas de drogas sintéticas estão sendo utilizadas na tentativa de combater à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos (COUTINHO et al., 2008; GIBBONS, 2004).

A associação de antimicrobianos é avaliada por sua capacidade de suprimir o surgimento de mutantes resistentes e produzir um efeito sinérgico *in vivo*. Tal efeito é capaz de prolongar a vida útil dos antimicrobianos atuais e, se usados em combinação com outros produtos, como os de origem natural podem representar um alternativa terapêutica no tratamento de infecções causadas por patógenos (MUSUMECI, 2013).

A possibilidade de potencializar o efeito de um antibiótico a partir de sua combinação com um produto de origem natural, tem sido estudada por vários pesquisadores, entre os quais Lavor et al. (2014) demonstraram que o extrato e frações obtidos de folhas de uma planta Euphorbiaceae apresentaram sinergismo quando associados aos aminoglicosídeos.

Além de extratos e frações que foram capazes de aumentar o efeito de antibióticos, recentemente macromoléculas específicas têm sido testadas, como é o caso das proteínas da classe das lectinas que possuem a habilidade de reconhecer e interagir com carboidratos, a exemplo foi observado à interação entre a lectina e o antibiótico gentamicina por meio da inibição da atividade hemaglutinante e o efeito modulador através do aumento da eficácia do antimicrobiano contra cepas multirresistentes de *S. aureus*, (SANTOS, V. et al., 2019b).

A lectina de *Parkia platycephala* teve sua atividade hemaglutinante inibida pelo antibiótico gentamicina e, sugere-se que a interação entre o antibiótico e a lectina se deu devido à presença de carboidratos na estrutura do antimicrobiano. Além disso, foi observado que uma dose sub-inibitória da lectina foi capaz de aumentar o efeito do antibiótico gentamicina contra cepas multiressistentes (SILVA et al., 2019).

Além da inibição da atividade hemaglutinante, técnicas de espectroscopia de fluorescência e docking molecular demonstraram que a lectina das sementes de *Dioclea*

violacea interage com o antibiótico gentamicina e apesar desta lectina não apresentar atividade antimicrobiana em concentrações menores que $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando associada ao antibiótico potencializa o efeito do mesmo frente às cepas multiresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. Sendo ainda capaz de inibir o mecanismo de tolerância de *S. aureus* à gentamicina e diminuir o grau de nefrotoxicidade nos rins de ratos tratados com a combinação DVL-gentamicina (SANTOS, V. et al., 2019b).

2.3 Gentamicina

Gentamicina é um antibiótico bactericida pertencente ao grupo aminoglicosídeo usado para o tratamento de diferentes infecções bacterianas, principalmente para infecções do trato urinário, pneumonia, infecção óssea, meningite e doenças inflamatórias pélvicas. Gentamicina consiste em um número diferente de compostos relacionados, incluindo gentamicina C1, C1a e C2 (que possuem 80% de atividade antibacteriana) enquanto; gentamicina A, B, X (possui 20% de atividade antibacteriana) (VYSAKH et al., 2018).

A gentamicina atua ligando-se à subunidade ribossômica 30S, que causa erros na ordem e no tipo de aminoácidos inseridos na cadeia polipeptídica, causando interrupção do alongamento da cadeia peptídica e morte bacteriana (PERIANU; RAU; VIJAN, 2019; PRATT et al., 2018).

A utilização de antibióticos como a gentamicina tem a finalidade de amenizar ou inibir a resistência bacteriana, no entanto, algumas bactérias podem apresentar mecanismos contra a ação do antibiótico. Os quatro principais mecanismos são: a modificação ou destruição enzimática do antibiótico (ex: enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) que modificam covalentemente os grupos hidroxila ou amino da molécula de aminoglicosídeo) (RAMIREZ; TOLMASKI, 2010); a prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico (ex: resistência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ao imipenem) ou da existência de bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas (ex: resistência da família das enterobacteriáceas às tetraciclinas); as alterações nas moléculas alvo dos antibióticos (ex: resistência intrínseca das bactérias do género *Enterococcus* às cefalosporinas), e a produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico, enquanto se continua a produzir as moléculas alvo originais, contornando desse modo a inibição induzida pelo antibiótico (ex: resistência da bactéria *Staphylococcus aureus* à metilicina) (HAWKEY, 1998; FORBES, SAHM,

WEISSFELD, 2007; LOUREIRO et al., 2016).

Com a intenção de impedir a ação destes mecanismos, efeito sinérgico de moléculas e o antibiótico gentamicina já vêm sendo descrito, como no trabalho de Alves et al. (2019) em que o óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth (BETIS-WHITE) quando acoplado à gentamicina, agiu sinergicamente a partir de ensaios de CIM (Concentração Inibitória Mínima). Há trabalhos que relatam a interação de lectinas com o antibiótico gentamicina, demonstrando essa interação por meio de testes de inibição da atividade hemaglutinante, refletindo no aumento do efeito do antibiótico contra cepas multiresistentes (SANTOS, V. et al., 2019a). Uma outra lectina de *P. platycephala* demonstrou capacidade de aumentar a ação antibiótica da gentamicina contra cepas bacterianas multiresistentes (SILVA et al., 2019).

2.4 Aspectos histórico, estruturais e de classificação das lectinas

O estudo com lectinas data desde o século XIX, quando evidências apontavam a existência de proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos, essas proteínas eram chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas, pois eram encontradas, em sua maioria, em plantas (SHARON; LIS, 2004).

Em 1860 o pesquisador Silas Weir Mitchell, observou que o sangue de pombo na presença de veneno da serpente *Crotalus durissius*, apresentava coagulação das hemácias. Stillmark (1888) descreveu o efeito tóxico de sementes de *Ricinus communis* e foi o primeiro a associar a capacidade hemaglutinante ao fator proteico tóxico da ricina. Landsteiner e Raubitishek (1908) estudaram a seletividade das aglutininas, destacaram a característica não tóxica das lectinas, e a partir de então foram descobertos outros vegetais com a mesma característica não tóxica e hemaglutinante (SHARON; LIS, 2004).

A primeira purificação de lectina foi realizada em 1919 por James Sumner, a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*. Sumner isolou uma proteína que denominou de Concanavalina A (Con A), através de precipitação salina e cristalização, deste modo obteve-se a primeira hemaglutinina pura (SHARON; LIS, 2004). Renkonen e Boyd em 1948 e Regueira em 1949, relataram que algumas hemaglutininas apresentam uma clara preferência a um tipo de eritrócito específico dentro do sistema sanguíneo ABO (VAN DAMME et al., 1998).

Boyd e Shapleigh em 1954 definiu um novo termo a essas proteínas, o termo “lectina”, que vem da palavra latina “legere”, que significa “selecionar” (LAM; NG,

2010). Em 1972, o termo lectina foi generalizado para todas aquelas proteínas que possuíssem a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas (SHARON; LIS, 1972), ocorrendo inibição desta atividade por carboidratos (RÜDIGER, 1998). Foi em 1960 que, Petter Nowell demonstrou que as lectinas das sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possuía atividade mitogênica sobre linfócitos (SHARON; LIS, 2004).

Posteriormente percebeu-se que as lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, desde microorganismos, plantas e animais. Podendo atuar na mediação do reconhecimento biológico de muitos eventos ligados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação (CAVADA et al., 2001).

As lectinas vegetais constituem um grupo heterogêneo de proteínas por serem diferentes entre si no que diz respeito às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas (VAN DAMME et al., 1998). Apresentam diversidade estrutural e o aspecto comum entre estas moléculas é a presença de pelo menos um sítio de ligação a carboidrato em cada cadeia polipeptídica (XIMENES, 2009).

Comumente, as lectinas de leguminosas consistem de duas ou quatro subunidades idênticas ou quase idênticas (protômeros) de 25 a 30 kDa cada, que geralmente são um único polipeptídeo cadeias de cerca de 250 aminoácidos apresentando um ou dois *N*-oligosacarídeos ligados. Cada protômero contém um local de combinação de carboidratos, um Ca^{2+} firmemente ligado e um íon metálico, geralmente Mn^{2+} (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005).

De acordo com Van Damme et al. (1998), as lectinas extraídas a partir de vegetais são classificadas considerando suas habilidades de reconhecimento e especificidade de ligação de maneira reversível aos carboidratos e seus aspectos estruturais, estando organizadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são proteínas que apresentam em sua estrutura apenas um domínio ligante de carboidrato, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados, visto que, são monovalentes; por exemplo, tem-se a *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991). Já as hololectinas são um grupo de lectinas que possuem dois ou mais domínios que interagem com carboidratos iguais ou similares. As quais podem ser divalentes ou multivalentes, apresentam ainda a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Maioria das lectinas

compreende esta classe, entre elas, as espécies da subtribo Diocleinae (CAVADA et al., 2001). As quimerolectinas são proteínas com um domínio ligante a carboidrato que está associado a outro domínio catalítico ou atividade biológica distinta atuando independente do domínio de ligação de carboidratos. De acordo com o número de domínios ligantes à carboidratos, esta classe de lectinas pode ser considerada como merolectinas ou hololectinas, à exemplo têm-se a ricina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Por fim, as superlectinas são reconhecidas como uma classe de hololectinas que possuem, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos. Entretanto, estes domínios diferentes das hololectinas, não são iguais e nem similares os fazendo capazes de reconhecer carboidratos diferentes em sua estrutura. Lectina do bulbo de tulipa é uma superlectina que apresentam dois domínios de ligação a carboidrato, a manose e *N*-acetil-galactosamina (VAN DAMME et al., 1996).

Análises de genoma / transcriptoma de plantas forneceram evidências para a ocorrência de muitas proteínas contendo um ou mais domínios de lectina incorporados em uma arquitetura de múltiplos domínios mais ou menos complexa (VAN DAMME et al., 2008). Devido a esta complexidade e heterogeneidade entre todas as proteínas de ligação a carboidratos, é preferível considerar a classe de lectinas vegetais em termos dos domínios de ligação a carboidratos presentes nessas proteínas (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

2.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas

As lectinas, por se ligar a glicoconjugados, mostram ser importantes instrumentos em diversas áreas da ciência, em especial, em processos médicos, químicos e biológicos, estando distribuídas na natureza, desde microorganismos, plantas e animais (XIMENES, 2009).

Lectinas de fungos revelaram atividades imunomoduladoras, mitogênicas, antiproliferativas, antitumoral, antiviral e antimicrobiana (HASSAN et al., 2015; SINHG; KAUR; SINGH, 2014). Um grande número de lectinas de algas também atraiu atenção considerável para aplicações biomédicas, incluindo anti-HIV, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória e atividades antinociceptivas (WATANABE et al., 2013). Lectinas animais desempenham um papel em vários processos fisiológicos, como a metástase de câncer, vias de apoptose e imunomodulação (KILPATRICK, 2002; LIU et al., 2012).

As lectinas vegetais pertencentes a família Leguminosae, apresentam em geral,

várias aplicações biológicas, como mediadores da resposta inflamatória e imune; agentes antivirais, antibacterianos, antinociceptiva, antifúngicos, anti-helmínticos, efeito cicatrizante, liberação de drogas, marcadores histoquímicos, biossensores de doenças e atividades antitumorais (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005; SANTOS, A. et al., 2019; BATISTA et al., 2018; SOUZA et al., 2011; LIMA et al., 2010).

Determinadas espécies de bactérias produzem lectinas específicas para carboidratos distintos, e fazem o uso da mesma para se aderir ao tecido hospedeiro como primeiro passo em um processo infeccioso. Visto isso, a utilização das lectinas é alvo de intensas pesquisas pela indústria farmacêutica para seu uso contra infecções (SHARON; LIS, 1993; RUDIGER et al., 2000).

A atividade antimicrobiana das lectinas pode resultar de sua capacidade de interagir com os carboidratos na superfície das células dos micróbios. Lectinas antibacterianas podem interagir com componentes da parede celular bacteriana tais como *N*-acetilglucosamina, ácido *N*-acetilmurâmico (MurNAc), tetrapeptídeos ligados a MurNAc e lipopolissacarídeos (GOMES et al., 2013).

2.6 Lectinas de plantas

As lectinas estão extensivamente distribuídas no reino vegetal e constituindo principalmente as famílias Leguminosae, Algae, Euphorbiaceae, Gramineae, dentre outras. A família Leguminosae tem o maior grupo de lectinas bem caracterizadas, que são interessantes devido a uma variedade de especificidade de carboidratos, maior disponibilidade na natureza (HIVRALE; INGALE, 2013), sua abundância nas sementes e aos processos de purificação, que em sua maioria, exige apenas um único passo cromatográfico (CAVADA, 2001), estas, também são encontradas em outros tecidos vegetais, tais como folhas (RATANAPO et al., 2001), raízes (PEUMANS et al., 1997; VAN DAMME et al., 1997), tubérculos (SUSEELAN et al., 2002), látex, néctar, flores (SESHAGIRIRAO; PRASAD, 1995) e frutos (SAMPIETRO et al., 2001).

As lectinas extraídas de plantas apresentam funções biológicas que estão ligadas diretamente com suas propriedades estruturais diferenciadas e com sua habilidade intrínseca em reconhecer e ligar-se especificamente a carboidratos (XIMENES, 2009), apresentam funções como, transporte e armazenamento de carboidratos; reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou organismos); proteção contra patógenos e insetos; proteínas de reserva ou reguladoras de crescimento (PUSZTAI, 1991).

2.7 Características da espécie *Machaerium acutifolium* Vogel

Machaerium acutifolium é uma espécie pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Papilionoideae, da tribo Dalbergieae de acordo com o sistema de classificação APG II (Angiosperm Phylogeny Group II) (2003). A abrangência ecológica da família permite a ocupação dos mais diversos habitats, é uma característica peculiar e de relevante significado para a sua grande riqueza nas formações vegetacionais neotropicais (LIMA, 2000). É conhecida popularmente como pau-muchiba, guaximbé, jacarandá-do-campo, jacarandá-bico-de-pato, pau-muchiba, bico-de-pato ou sapuva. Está presente em vegetação do tipo caatinga, campo rupestre, cerrado, floresta ciliar ou galeria, floresta estacional decidual, floresta estacional semidecidual. Logo ela possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil, habitando em todas as regiões. Esta espécie pode ser também encontrada no sul do México ao norte da Argentina, com ocorrência em quase toda a América Central e do Sul (FLORA DO BRASIL *online*, 2019).

Ecologicamente, o sucesso das Leguminosae tem sido atribuído aos seus métodos de defesa (acúleos, e metabólitos secundários), a eficiência na reprodução e principalmente, a capacidade de adquirir substâncias essenciais para o crescimento (POLHILL, 1981).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a interação e a capacidade da lectina das sementes de *Machaerium acutifolium* (MaL) em modular a atividade antibiótica da gentamicina em bactérias multiressistentes.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a interação da lectina e o antibiótico gentamicina através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina de *M. acutifolium*;
- Avaliar o efeito modulador da lectina de *M. acutifolium* no antibiótico gentamicina frente às cepas bacterianas multirresistentes;
- Analisar o efeito da lectina de *M. Acutifolium* na inibição da tolerância à gentamicina.

4 METODOLOGIA

Os experimentos de purificação foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular – LaBEM, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – CCAA, Chapadinha, Maranhão, Brasil.

4.1 Coleta e identificação das amostras

As sementes de *M. acutifolium*, utilizadas nos experimentos deste trabalho, foram coletadas na cidade de Crato, no estado de Ceará, Brasil. A planta foi identificada no Herbário de Andrade-Lima/Universidade Regional do Cariri, número 13.480, e registrada no SISGEN (Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: A6D883E).

4.2 Purificações da lectina

As sementes de *M. acutifolium* foram moídas para obtenção de um pó fino usando um moinho elétrico de café. A farinha resultante foi diluída na proporção 1:10 (m/v) em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,6) contendo NaCl 150 mM e incubada à temperatura ambiente sob agitação contínua por 4 h antes da centrifugação a 4000g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante (extrato bruto) foi precipitado pela adição de sulfato de amônio a 60% de saturação na solução (fração de 0 a 60%), e o precipitado foi centrifugado (4000g, 20 min). O sedimento foi solubilizado em um volume mínimo de tampão de extração.

A fração 0-60% foi carregada em uma coluna (1,0 x 3,5 cm) de matriz de agarose-manose (Sigma Aldrich) equilibrada com o mesmo tampão de extração. As proteínas não ligadas foram dessorvidas com o tampão de partida (1,0 mL min⁻¹) e a lectina foi eluída com glicina 100 mM, pH 2,6. O material eluído foi coletado manualmente em frações de 1,5 mL e monitorado no espectrofotômetro em uma absorbância de 280 nm. A fração ativa foi dialisada contra água destilada e posteriormente foi liofilizada.

A lectina foi solubilizada em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e centrifugada a 4000g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em uma coluna DEAE-Sephacel™ (2,0 x 5,0 cm) e equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0. As proteínas ligadas foram lavadas com tampão de equilíbrio e as proteínas adsorvidas foram eluídas com tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 (1,0 mL min⁻¹), contendo um gradiente salino escalonado de 0 a 1 M e foram recolhidas frações de 1,5 mL manualmente.

A lectina de *M. acutifolium* purificada (MaL) foi submetida a eletroforese em gel

de dodecil sulfato de sódio a 12,5% - poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições de desnaturação (LAEMMLI, 1970). Após a eletroforese, os géis de SDS-PAGE foram corados com azul brilhante de Coomassie (R-350).

4.3 Caracterização da interação lectina-gentamicina

A interação entre a MaL e o antibiótico gentamicina foi determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, utilizando uma solução de gentamicina na concentração de 0,1 M, conforme o protocolo descrito por Ramos et al. (1996).

Em placas de microtitulação, foram adicionados em todos os poços 50 µL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, em seguida, 50 µL da solução de gentamicina no primeiro poço, homogeneizando, e a posteriori diluindo três vezes em cada poço e passando para o seguinte até o último poço, que ficou com volume final de 100 µL, após, foi adicionado 50 µL da MaL com título de 4 unidades hemaglutinantes (U.H.) em cada poço. Após 1 h de incubação, foram adicionados 50 µL de eritrócitos de coelho a 3% em cada poço.

O resultado da inibição da atividade hemaglutinante foi definido como a menor concentração (mg mL^{-1}) do antibiótico necessária para inibir a atividade hemaglutinante (CIM), o qual foi observado 2 h após a adição dos eritrócitos. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Reagentes e drogas

A MaL e o antibiótico gentamicina foram dissolvidos em água estéril a uma concentração final de 1024 mg mL^{-1} .

4.4.2 Cepas bacterianas

Para a realização dos ensaios de concentração inibitória mínima e de modulação da atividade antibiótica foram utilizados cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* 06 e *Pseudomonas aeruginosa* 15 (Tabela 1).

As cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM da Universidade Regional do Cariri – URCA. Estas foram mantidas em ágar a base de sangue (Laboratory Difco Ltda) e cultivados a 37 °C em ágar Heart Infusion (HIA, Difco Laboratorises Ltda).

Tabela 1. Fonte bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.

Estirpes	Fonte	Perfil de resistência*
<i>E. coli</i> 06	Cultura de urina	Cf, Cef, Ca, Cro, Ca, Cef, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amox, Mox.
<i>S. aureus</i> 10	Cotonete retal	Cip, Lev, Asb, Amc, Cla, Azi, Clin.
<i>P. aeruginosa</i> 15	Ponta do cateter	Cpm, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer.

*Amp-Ampicilina; Asb-Ampicilina + Sulbactam; Amox-Amoxicilina; Amc-Amoxicilina + Ac. clavulânico; Azi-Azitromicina; Ca-cefadroxil; Cf-cefalotina; Cef-Cefalexina; Cla-Claritromicina; Cro-Ceftriaxona; Cip-Ciprofloxacina; Clin-Clindamicina; Imi - imipenem; Lev-levofloxacina; Mer Meropenem; Mox-Moxifloxacina; Oxa-oxacilina, Pen-Penicilina; Ptz - Piperacilina + Tazobacta.

4.4.3 Preparação e padronização do inóculo

Após o cultivo e crescimento dos microrganismos no período requerido, os inóculos foram preparados de acordo com o CLSI (2008). As bactérias foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de soro fisiológico estéril (NaCl a 0,9%), então esta suspensão foi agitada com auxílio de um aparelho de vórtex e sua turbidez foi comparada e ajustada com base na escala de McFarland, que corresponde a 10^6 CFU/mL.

4.4.4 Teste de Concentração Inibitória Mínima

Para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram utilizados eppendorfs para a preparação contendo 100 μ L do inóculo e 900 μ L do meio de cultura líquido Brain Heart Infusion Broth (BHI) em concentração de 10%, posteriormente foram usadas placas de microtitulação de 96 poços que foram preenchidas no sentido numérico pela adição de 100 μ L desta solução em cada poço, seguido da realização de diluição em série com 100 μ L da solução de lectina variando as concentrações de 1024 μ g mL⁻¹ a 1,0 μ g mL⁻¹. As placas foram transferidas para a incubadora durante 24 horas a 37 °C. Para a leitura da CIM bacteriana, foram adicionados a cada poço 20 μ L de um indicador de crescimento bacteriano (resazurina), após uma hora a mudança de cor dos poços foi observada, onde a modificação da coloração azul para vermelha corresponde ao crescimento microbiano e a permanência em azul corresponde a ausência de crescimento, conforme estabelecido pelo CLSI (2008).

4.4.5 Efeito modulador da atividade antibiótica

A avaliação da lectina como agente modulador da atividade da gentamicina foi realizada segundo Coutinho et al. (2017). Os testes foram realizados em triplicata. Para cada eppendorf, foram utilizados 1162 μL de BHI a 10%, com 150 μL do inoculo de cada cepa multirresistente e a solução contendo a lectina testada com volume correspondente a uma concentração subinibitória (CIM/8). Os controles foram preparados utilizando 1350 μL de BHI (10%) e 150 μL de suspensão bacteriana. As placas foram preenchidas em ordem numérica e cada poço recebeu 100 μL de solução. Em seguida foi realizada a diluição em série com 100 μL da solução da gentamicina variando as concentrações de 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As placas foram transferidas para a incubadora durante 24 h à 37 °C. Para a leitura da CIM bacteriana, foram adicionados a cada poço 20 μL de resazurina.

4.4.6 Perfil da tolerância bacteriana à gentamicina

Para a avaliação da influência da MaL no perfil da tolerância à gentamicina foram utilizadas cepas de *S. aureus* ATCC 6538 fornecidas pela coleção microbiológica da Universidade Ceuma (São Luís, Brasil).

Foram realizadas sucessivas culturas de *S. aureus* na presença de concentração sub-inibitória (CIM/2) de gentamicina e MaL (CIM/8). Primeiramente, uma suspensão de *S. aureus* foi diluída (1:50) em caldo BHI contendo os compostos testados. Após 48 h, a CIM para gentamicina foi determinada. Depois disso, as bactérias foram cultivadas em caldo BHI contendo os compostos testados por 24 h, após cada ciclo de 24 horas a CIM de gentamicina foi determinada. Este procedimento foi repetido por 10 dias. A concentração da droga (CIM) para cada nova passagem foi baseada na CIM calculada para a passagem anterior.

4.5 Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0. Os dados serão analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando como dados centrais a média geométrica das triplicatas \pm erro padrão da média. Em seguida, será realizado um teste *post hoc* de Tukey, sendo os valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da lectina de *M. acutifolium* (MaL)

A purificação da lectina das sementes de *M. acutifolium* (MaL) seguiu o protocolo de Santos, A. et al. (2019). O PI coletado da cromatografia de afinidade em matriz agarose-manose representa a fração das macromoléculas que não interagiram com a resina de polissacarídeos. Posteriormente se obteve o PII que representa a fração retida, a mesma foi dissociada da matriz de polissacarídeos ao adicionar um tampão de eluição, Glicina 100 mM, pH 2,6 (Figura 1).

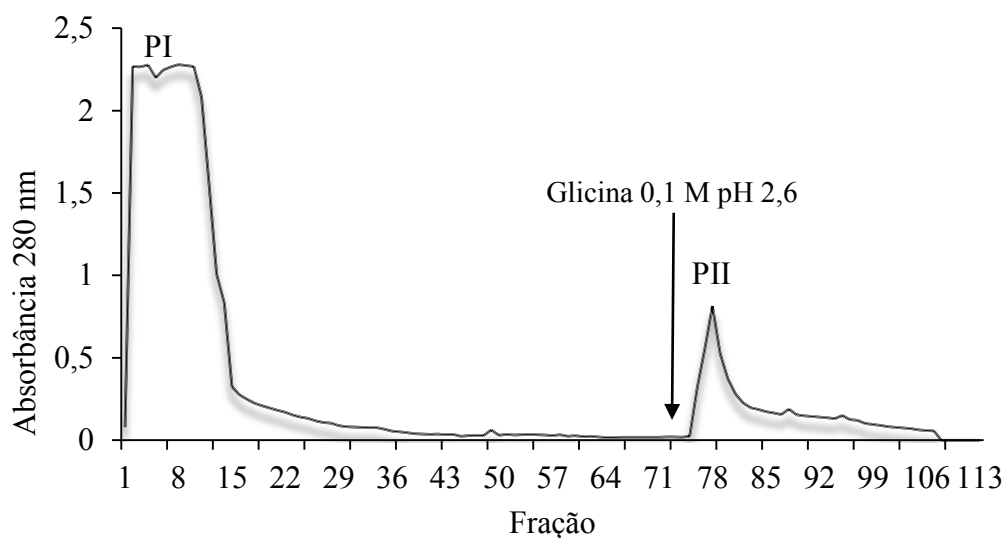


Figura 1. Perfil da eluição da cromatografia em agarose-manose, absorbância monitorada em 280 nm.

A cromatografia de afinidade é muito usada para o isolamento de macromoléculas, ocupando uma posição ímpar na tecnologia de separação de proteínas visto que se baseia em interações moleculares bioespecíficas do tipo não covalentes (HELMHOLZ et al., 2003; ROMERO et al., 2017).

Lectinas ligantes a glicose/manose foram purificadas em matriz de agarose-manose, tais como *Pouteria torta* (BOLETI, 2003) e *Mauritia flexuosa* L. (NEGREIROS, 2016). Da tribo Dalbergieae, lectinas de *Platypodium elegans* (BENEVIDES, 2011), *Platymiscium floribundum* (PEREIRA-JUNIOR et al., 2012), *Centrolobium tomentosum* (ALMEIDA et al., 2016) e *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS et al., 2015).

O PII obtido na agarose-manose foi submetido ao segundo passo, aplicado em cromatografia de troca iônica em coluna DEAE Sephacel™ (dietilaminoetil) escalonado em solução salina, que se resume em um método de separação baseado na adsorção

reversível e diferencial dos íons, que se devem as diferenças de carga e a força iônica; a fração ativa de hemaglutinação, foi obtida em NaCl 100 mM (Figura 2).

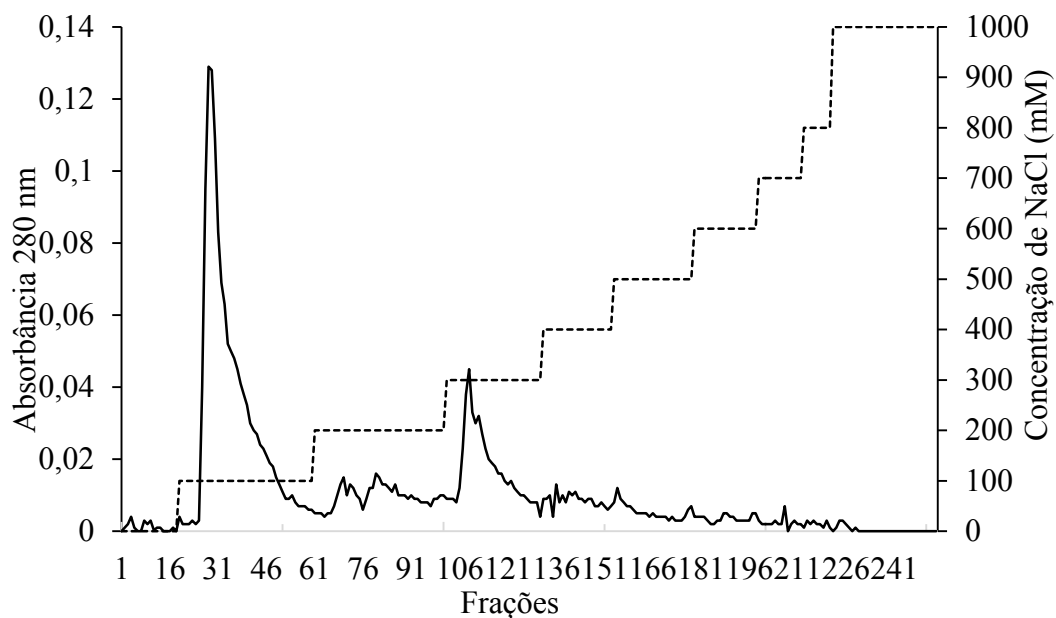


Figura 2. Perfil da eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE Sephacel™.

O SDS-PAGE da fração de Sephacel™ PI DEAE evidenciou que a MaL é composta por três bandas na presença ou ausência do agente redutor β -mercaptoetanol, apresentando uma cadeia principal de 29 kDa (cadeia α) e duas cadeias menores de 13 kDa (cadeia β) e 8 kDa (cadeia γ) (Figura 3). Corroborando com o trabalho de Santos, A. et al. (2019), em que a MaL apresentou as referidas três bandas já mencionadas. Resultado semelhante foi demonstrado por Araripe et al. (2017) onde observou-se que a lectina purificada de *P. elegans* possui uma cadeia de aproximadamente 30 kDa e duas cadeias menores de 19 kDa e 10 kDa.

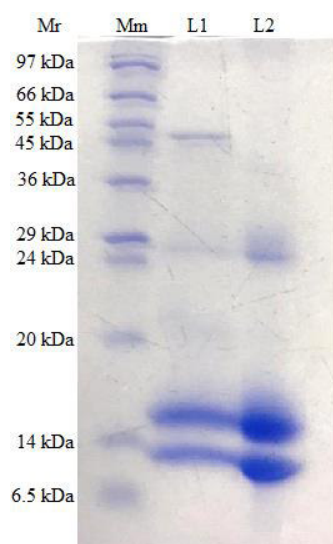


Figura 3. Perfil SDS-PAGE, (Mr) massa relativa em kDa (Mm), Marcador molecular de massa: fofosrilase b, 97 kDa; albumina de soro bovino, 66 kDa; desidrogenase glutâmica, 55 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa; α -lactalbumina, 14.2 kDa e aprotina 6.5 kDa. (L1) PII agarose manose da fração0-60%. (L2) PI DEAE.

5.2 Estudo da interação MaL-gentamicina

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante evidenciou que a MaL possui afinidade com gentamicina, glicose, manose e o derivado de manose α -metil-D-manopiranosídeo, enquanto não foi observada afinidade significativa para os demais carboidratos testados (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito inibitório de monossacarídeos e gentamicina da atividade hemaglutinante da MaL.

Substâncias	CIM* (mM)
Gentamicina	12,5
D-Manose	12,5
α -metil-D-manopiranosídeo	6,25
D-Glicose	25
D-Galactose	NI**
β -Lactose	NI

*CIM, concentração inibitória mínima.

**NI, substância não inibiu até uma concentração de 100 mM.

A interação lectina-gentamicina já foram elucidados por Santos, V. et al. (2019a), que relataram a inibição da atividade hemaglutinante da lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) na presença de gentamicina com CIM de 50 mM. Ainda que ambas as lectinas apresentem afinidade com gentamicina, observou-se que a MaL apresentou uma maior afinidade pelo antibiótico em relação à VML. Este resultado corrobora com um recente trabalho de Santos, V. et al. (2019b), que mostra a interação da lectina de *Dioclea violacea* (DVL) e o antibiótico gentamicina, onde a CIM da DVL foi igual a da MaL.

5.3 Estudo da atividade antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana foi realizado contra três linhagens de cepas multiresistentes de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, e avaliado a CIM, observou-se que MaL não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas (CIM $\geq 1.024 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esses valores não são considerados clinicamente relevantes por seu efeito antibacteriano direto. Considera-se que valores de CIM superiores a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ não possuem atividade antibacteriana direta na prática clínica (HOLETZ et al., 2002).

5.4 Estudo da modulação da atividade antibiótica

Visto que a MaL não inibiu o crescimento bacteriano nas concentrações testadas, foi avaliado se a interação lectina-gentamicina teria a capacidade de modificar o efeito do antibiótico contra cepas multiresistentes.

Os resultados mostraram que a MaL foi capaz de aumentar a atividade da gentamicina contra *S. aureus*, diminuindo a CIM de 50,8 para $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4A). Proporcionalmente, esse valor equivale a uma redução de 92,1% na quantidade de gentamicina necessária para ter o mesmo efeito na cepa em estudo. Contra cepas de *E. coli* também houve uma redução na CIM que passou de 32 para $25,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ na presença da MaL (Figura 4B), o que corresponde a uma redução de 20,6% na quantidade de gentamicina necessária para ter o mesmo efeito em *E. coli*. No entanto, a MaL não apresentou efeito significativo na modulação da atividade da gentamicina contra a cepa de *P. aeruginosa* (Figura 4C).

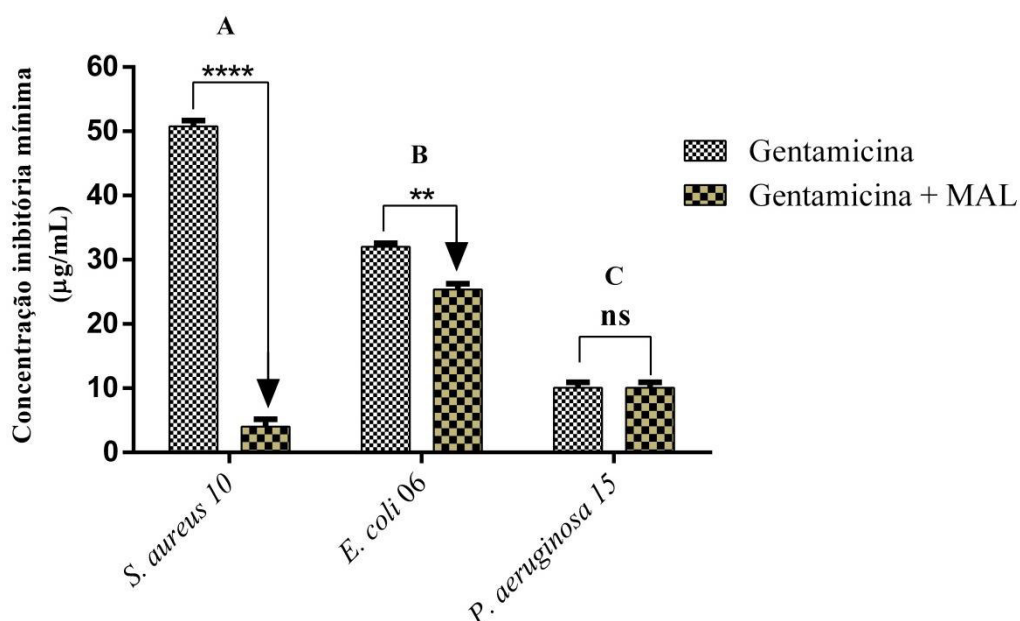


Figura 4. Modulação da atividade antibiótica da gentamicina complexada com a MaL. **A.** Modulação da atividade antibiótica contra *S. aureus* 10. **B.** Modulação da atividade antibiótica contra *E. coli* 06. **C.** Modulação da atividade antibiótica contra *P. aeruginosa* 15. **Asteriscos** indicam diferença estatisticamente significante com $p < 0,0001$; **ns**, valor não estatisticamente significativo com $p > 0,05$.

O aumento da atividade bactericida de aminoglicosídeos associados a produtos naturais, como as lectinas, pode ser considerado uma alternativa ao uso combinado de diferentes classes de antibióticos em um único fármaco, sendo uma estratégia promissora no combate a resistência bacteriana (BEZERRA et al., 2017; GOMES et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). Alguns estudos mostraram ainda que as lectinas podem interagir com glicanos presentes nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HENDRICKSON et al., 2019).

No ensaio em que foi administrado somente a MaL, não houve a inibição do crescimento microbiano, no entanto, a sua associação com gentamicina apresentou um aumento na atividade antibiótica contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. Em virtude disto, presume-se que a MaL tem a habilidade de aumentar a atividade antibiótica da gentamicina pelo mecanismo de interação com a gentamicina no CRD, onde através do reconhecimento aos carboidratos presentes na membrana irá entregar a droga para as células-alvo levando à liberação da gentamicina, facilitando assim a entrada do antibiótico no citoplasma bacteriano. Corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho Silva et al. (2019), também sugerem a possibilidade das lectinas aumentarem a atividade antibiótica da gentamicina por dois mecanismos distintos: (1) interagindo com gentamicina no CRD e facilitando a entrada do antibiótico no

citoplasma bacteriano ou (2) interagindo com glicanos presentes nas bombas de efluxo e consequentemente bloqueando, ou modificando, sua estrutura conformacional, fazendo-se necessário ensaios mais aprofundados para elucidar tais questões.

O trabalho de Cruz et al. (2019) evidenciaram que o lupano triterpeno 3β , 6β , 16β -trihidroxylup-20 (29) -eno (CLF1) isolado de *Combretum leprosum*, quando associado ao antibiótico gentamicina aumentou a atividade antimicrobiana da droga contra a cepa de *E. coli* 06 multirresistente, relataram também efeitos sinérgicos contra a cepa de *S. aureus* 10. Resultados semelhantes foram demonstrados por Santos, V. et al. (2019b) onde estes observaram que a lectina também ligante a glicose-manose extraída das sementes de *Dioclea violacea* (DVL) foi capaz de potencializar o efeito da gentamicina contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*.

5.5 Avaliação da tolerância bacteriana à gentamicina

A exposição a longo prazo de uma população bacteriana ao tratamento com antibióticos está associada ao desenvolvimento de fenótipos que permitem sua sobrevivência sob estresse induzido por drogas (ZINNER et al., 2018). Esse fenômeno resulta no surgimento de resistência a medicamentos devido a mutações em diferentes genes (LEVIN-REISMAN et al., 2017). Nesse sentido, examinou-se a capacidade da MaL inibir a aquisição do fenótipo adaptativo por *S. aureus* quando submetida a exposição contínua à gentamicina. Neste ensaio, as bactérias foram tratadas com a concentração Sub-inibitória de gentamicina (CIM/2) na presença ou ausência da MaL. A CIM inicial para gentamicina foi de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. A princípio o *S. aureus* elevou de maneira rápida e gradual a CIM para esta droga, aumentando em 16 vezes após quatro dias de exposição. Ao final do ensaio, as bactérias tratadas com gentamicina apresentaram um valor de CIM de $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ para esta droga aumentando a CIM 128 vezes (Figura 5). Este efeito foi drasticamente alterado pela associação da MaL com a gentamicina e *S. aureus*, nesse grupo, o valor da CIM aumentou apenas após dois dias de exposição e, no final do período experimental (dez dias), as bactérias apresentaram um aumento de 4 vezes a CIM, $16 \mu\text{g mL}^{-1}$.

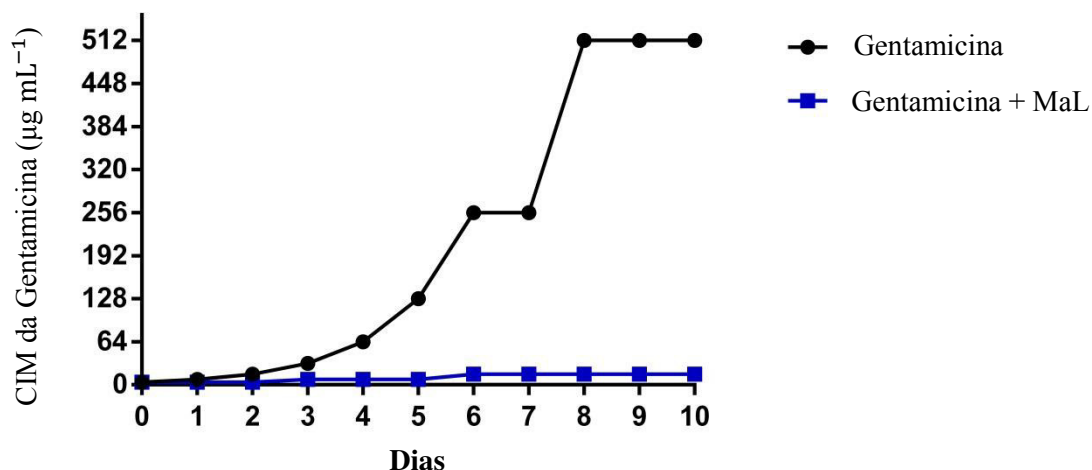


Figura 5. Efeito da MaL na inibição da tolerância à gentamicina por *S. aureus*.

A MaL melhorou significativamente o efeito da droga, reduzindo assim a capacidade do *S. aureus* de adquirir tolerância ao fármaco. Estes resultados corroboram com o de Santos, V. et al. (2019b), que sugerem que a coadministração da DVL com o antimicrobiano gentamicina pode ser uma estratégia valiosa no combate ao desenvolvimento de novas cepas resistentes.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a lectina das sementes de *Machaerium acutifolium* denominada MaL teve sua atividade hemaglutinante inibida pelo antibiótico gentamicina. Foi comprovado que no modelo experimental proposto a MaL por si só, não apresenta atividade antibacteriana clinicamente relevante, entretanto quando associada com a gentamicina foi capaz de aumentar o efeito do antibiótico contra bactérias multiresistentes de *S. aureus* e *E. coli*, mostrou-se ainda eficaz no combate ao desenvolvimento de novas cepas multiresistentes, tendo em vista que a mesma reduziu o perfil de tolerância de *S. aureus* frente à gentamicina.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C.; OSTERNE, V. J.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; SILVA-FILHO, J. C.; LOSSIO, C. F.; NASCIMENTO, F. L.; ALMEIDA, R. P.; TEIXEIRA, C. S.; LEAL, R. B.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A.; ASSREUY, A. M.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 15, p. 73-83, 2016.

ALVES, B. L.; MACHADO, A. L.; BEZERRA, A. J. T.; SERRA INÁCIO, C. F.; ROCHA, C. E.; SALES, J. E.; COUTINHO, H. D. M. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**. v. 131, n. 110559, 2019.

ARARIPE, D. A.; PINTO-JUNIOR, V. R.; NECO, A. H. B.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; PIRES, A. F.; LOSSIO, C. F.; MARTINS, M. G. Q.; CORREIA, J. L. A.; BENEVIDES, R. G.; LEAL, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K.S. ; CAVADA, B. S. Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 102, p. 323-330, 2017.

AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. "Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode," **Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 3, n. 9, p. 1593-1608, 2005.

BATISTA, K. L. R.; SILVA, C. R.; SANTOS, V. F.; SILVA, R. C.; ROMA, R. R.; SANTOS, A. L. E.; PEREIRA, R. O.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SOARES, A. M. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; TEIXEIRA, C. S. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectina reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 225, p. 67-72, 2018.

BENEVIDES, R. G. **Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina recombinante de sementes de *Platypodium elegans* Vogel**. 2011. Tese (Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2011.

BEZERRA, C. F.; CAMILO, C. J.; SILVA, M. K. N.; FREITAS, T. S.; RIBEIRO-FILHO, J.; COUTINHO, H. D. M. Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. **Microbial Pathogenesis**. v. 113, p. 265-268, 2017.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 13 p. 42-5, 2015.

BOLETI, A. P. A. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (Mart.) RADLK**. 2003. Tese (Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, 2003.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL NETTO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Sciences**. v. 2, p. 123-135, 2001.

CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty Second Informational Supplement. 9th ed. Document M100–S22. 2012.

CORDEIRO, I. F.; COUTINHO, H. D. M.; FERREIRA, J. V.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; MENEZES I.R.A.; LIMA, M. A.; FREITAS, T. S.; GONCALO, M. I. P.; ROCHA, F. L. G.; FURTADO, R. F. F.; ANDRADE, J. C. In Vitro Evaluation of the Antibacterial Activity and Antibiotic- Modulatory Effect of *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh. **Letters in Drug Design and Discovery**. v. 15, p. 227-230, 2018.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA, J. J. P.; LIMA, E. O. Atividade anti-estafilocócica in vitro de *Hyptis martiusii* Benth contra cepas de *Staphylococcus aureus*- MRSA resistentes à meticilina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 670-675, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES I.R.A.; COSTA, J. G. M.; FELIPE, C. F. B.; SANTOS V. S.; NASCIMENTO, E. P.; DELMONDES, G. A.; MONTEIRO, A. B. Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 22, p. 1-11, 2017.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. A atividade anti-estafilocócica in vitro de *Hyptis martiusii* Benth contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina MRSA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 670-75, 2018.

CRUZ, B. G.; TEIXEIRA, A. M. R.; SILVA, P. T.; EVARISTO, F. F. V.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA; P. N.; SENA-JÚNIOR, D. M.; BARRETO, V. P.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antimicrobiana do lupano triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -tri-hidroxilup-20 (29)-eno isolado de *Combretum leprosum* Mart. **Journal of Medical Microbiology**. v. 68, n. 10, p. 1438-1444, 2019.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development the failure of success? **Nature Biotechnology**. v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Diagnostic microbiology**. 12 Ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier, 2007.

FLORA DO BRASIL 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 19 Set 2019.

GANGULY, S.; PAUL, I.; MUKHOPADHAYAY, S. K. Immunomodulatory effects of fungal beta-glucans in fish farming. **Fishing Chimes: Nat. Fish. Journal**. v. 30 p. 64-64, 2010.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**. v. 21, p. 263-277, 2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**. v. 114, p. 672-679, 2013.

GOMES, F. M. S.; CUNHA, X. J.; SANTOS, J. F. S.; MATOS, Y. M. L. S.; TINTINO, S. R.; FREITAS, T. S.; COUTINHO, H. D. M. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**. v. 115, p. 175-178, 2018.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos : importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v. 33, p. 667-679, 2010.

HASSAN, M. A. A.; ROUF, R.; TIRALONGO, E.; MAY, T. W.; TIRALONGO, J. Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 4, p. 7802-7838, 2015.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **The British Medical Journal**. v. 317, n. 7159, p. 657-660, 1998.

HELMHOLZ, H.; CARTELLIERI, S.; HE, L.; THIESEN, P.; NIEMEYER, B. Process Development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography**. v. 1006, p. 127-135, 2003.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; APARÍCIO, C. D. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HIVRALE, A. U.; INGALE, A. G. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling and Behavior**. v. 8, n. 12, Article ID e26595, 2013.

JONES, M. B.; NIERMAN, W. C.; SHAN, Y.; FRANK, B. C.; SPOERING, A.; LING, L.; POVOS, A.; ZULLO, A.; LEWIS, K.; NELSON, K. E. Reducing the bottleneck in discovery of novel antibiotics. **Microbial Ecology**. v. 73, n. 3, p. 658-667, 2017.

KESSELHEIM, A. S.; OUTTERSON, K. Fighting antibiotic resistance: marrying new financial incentives to meeting public health goals. **Health Aff (Millwood)**. v. 29, n. 9, p. 1689-1696, 2010.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: epide-miology,

prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 478-482, 2017.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**. v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.

KUMAR, D.; ARYA, V.; KAUR, R.; BHAT, Z. A.; GUPTA, V. K.; KUMAR, V. A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 45, p. 165-184, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

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

LAVOR, A. K. L. S.; MATIAS, E. F. F.; ALVES E. F.; SANTOS, B. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; LEITE, N. F.; SOUZA, C. E. S.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; BRITO, D. I. V.; ALBUQUERQUE R. S.; COUTINHO, H. D. M.; Association Between Drugs and Herbal Products: In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae) **European Journal of Integrative Medicine**. v.6, p. 301-306, 2014.

LEVIN-REISMAN, I.; RONIN, I.; GEFEN, O.; BRANISS, I.; SHORESH, N.; BALABAN, N.Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**. v. 355, n. 6327, p. 826-830, 2017.

LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

LIMA, A. L. R.; CAVALCANTI, C. C. B.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2010, Article ID 179817, p. 1-6, 2010.

LIU, Z.; ZHANG, Q.; PENG, H.; ZHANG, W. Animal lectins: potential antitumor therapeutic targets in apoptosis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 168, n. 3, p. 629-637, 2012.

LOPES, J. A. **Avaliação do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e gastroprotetor do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* (Vell.)**. Dissertação - Botucatu, 2013.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista portuguesa de saúde pública**. v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**. v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MAJEE, S. B.; BISWAS, G. R. Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n. 47, p. 3444-3451, 2013.

MARCHESE, A.; BALISTRERI, G.; TONOLI, E.; DEBBIA, E. A. SCHITO, G. C. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 2, p. 866-869, 2000.

MODI, S. R.; COLLINS, J. J.; RELMAN, D. A. Antibiotics and the gut microbiota. **Journal of Clinical Investigation**. v. 124, n. 10, p. 4212-4218, 2014.

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; DUNBAR, D. C.; ELSOHLY, M. A. E.; KHAN, I. A. Antimalarial (+)-trans-Hexahydrodibenzopyran Derivatives from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**. v. 64, p. 1322, 2001.

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; DUNBAR, D. C. E.; FERREIRA, D. Antimicrobial and Antiparasitic (+)-trans-Hexahydrodibenzopyrans analogues from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**. v. 66, p. 804, 2003.

MUSUMECI, R. *Berberis aetnensis* C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 22, p. 48-53, 2003.

NEGREIROS, C. R. P. **Isolamento e caracterização parcial de isolectinas termoestáveis das sementes de *Mauritia flexuosa* L.f. aglutinante de *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. Dissertação (Recursos Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2016.

PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae. **Nova Science Publishers**. Inc., New York, 2013.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press: New York. cap. 10, 1995.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press: New York. cap. 16, 2005.

PEREIRA, Y. F.; COSTA, M. S.; TINTINO, R. S.; ROCHA, E. J.; GALVÃO, F. R. F.; DE SÁ, M. F. B.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SOUSA, E. O. Modulation of the Antibiotic Activity by the *Mauritia flexuosa* (Buriti) Fixed Oil against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Multidrug-Resistant (MDR) Bacterial Strains. **Pathogens**. v. 7, n. 4, p. 98-106, 2018.

PEREIRA-JUNIOR, F. N.; SILVA, H. C.; FREITAS, B. T.; ROCHA, B. A.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; LEAL, R. B.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-D-glucosamine-specific

- lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**. v. 25, n. 8, p. 443-449, 2012.
- PERIANU, E.; RAU, I.; VIJAN, L. E.;. DNA influence on norfloxacin fluorescence. **Spectrochim. Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 206, p. 8–15, 2019.
- PEUMANS, W. J.; WINTER, H. C.; BEMER, V.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I. J.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Isolation of a novel plant lectin with and unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate journal**. v. 14, p. 259-265, 1997.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. v.15, p.199-228, 1998.
- POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. Advances in legume systematics. Kew: Royal Botanic Gardens, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Great Britain), 1981.
- PRATT, V.; MCLEOD, H.; RUBINSTEIN, W.; DEAN, L.; MALHEIRO, A. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD). **Medical Genetics Summaries**. 2018.
- PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clinical Microbiology Infection**. v. 10, n. 4, p. 18-22, 2004.
- PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge University Press, 1991.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat**. v. 13, n. 6, p.151-71, 2010.
- RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 8, p. 193-199, 1996.
- RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**. v. 160, n. 4, p. 739-744, 2001.
- ROMERO, J. C. T.; TORRES, M. J. O.; BETANCOUR, J. A. I.; CAAVALCANTE, C. A. M. Isolamento de lectinas por cromatografia de afinidade. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**. v. 8, n. 1, 63-70. 2017.
- RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta anatomica**. v. 161, p. 130-152, 1998.
- RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÈNEZ-BARBEIRO, J.; ROMERO, A.; VON DER LEITH, C. W.; DIAZ-MARINO, T; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry**. v. 7, p. 389-416, 2000.

SALES, D. L.; MORAIS-BRAGA M. F. B.; SANTOS A. T. L. D.; MACHADO A. J. T.; ARAUJO FILHO, J. A.; DIAS D. Q.; CUNHA, F. A. B. D.; SARAIVA, R. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; FERREIRA, F. S.; ALVES, R. R. D. N.; ALMEIDA, W. O.; Antibacterial, modulatory activity of antibiotics and toxicity from *Rhinellajimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae) glandular secretions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 92, p. 554-561, 2017.

SAMPIETRO, A. R.; ISLÃ, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**. v. 160, p. 659-667, 2001.

SANTOS, A. L. E.; LEITE, G. O.; CARNEIRO, R. F.; ROMA, R. R.; SANTOS, V. F.; SANTOS, M. H. C.; PEREIRA, R. O.; SILVA, R. C.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; CAMPOS, A. R.; TEIXEIRA, C. S. Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-dglucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 664, p.149-156, 2019.

SANTOS, V. F.; COSTA, M. S.; CAMPINA, F. F.; RODRIGUES, R. R.; SANTOS, A. L. E.; PEREIRA, F. M.; BATISTA, K. L. R.; SILVA, R. C.; PEREIRA, R. O.; ROCHA, B. A. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. The galactose-binding lectin isolated from *Vatairea macrocarpa* seeds enhances the effect of antibiotics against *Staphylococcus aureus*-resistant strain. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 2019a.

SANTOS, V. F.; ARAÚJO, A. C. J.; SILVA, A. L. F.; ALMEIDA, D. V.; FREITAS, P. R.; SANTOS, A. L. E.; ROCHA, B. A. M.; GARCIA, W.; LEME, A. M.; BONDAN, M.; BORGES, F. T.; CUTRIM, B. S.; SILVA, L. C. N.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. *Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2019b. doi: 10.1016 / j.ijbiomac.2019.09.207.

SCHITO, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 12 p. 3-8, 2006.

SESHAGIRIRAO, K.; PRASAD, M. N. Purification and partial characterization of a lectin from *Euphorbia nerifolia* latex. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, n. 6, p. 1199-204, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-Aggluninating and Sugar-Specific proteins. **Science**. v. 177, n. 4053, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**. v. 268, p. 82-89, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, n. 11, p. 53-64, 2004.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. Santa Cruz do Sul. v. 8, n. 4, p. 1-11, 2018.

SILVA, R. R. S.; SILVA, C. R.; SANTOS, V. F.; BARBOSA, C. R. S.; MUNIZ, D. F.; SANTOS, A. L. E.; SANTOS, M. H. C.; ROCHA, B. A. M.; BATISTA, K. L. R.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial Pathogenesis**. 2019.

SINGH, R. S.; KAUR, H. P.; SINGH, J. Purification and characterization of a mucin specific mycelial lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: application for mitogenic and antimicrobial activity. **PLOS ONE**. v. 9, n. 10, 2014.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. A new *Bauhinia monandra* galactose specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUEBARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**. v. 30, n. 7, p. 641-57, 2013.

STILLMARK, H. **Über Ricin, ein giftiges Ferment uas den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen**. Tese de doutorado - Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; AND KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 407, p. 241-247, 2002.

TASUMI, S.; YANG, W. J.; USAMI, T.; TSUTSUI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; WINDER, M. N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y. Characteristics and primary structure of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental Comparative Immunology**. v. 28, p. 325-335, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UNITT, J.; HORNIGOLD, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. **Biochem Pharmacol**. v. 81, p. 1324-1328, 2011.

VAN DAMME, E. J. M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**. v. 236, n. 2, p. 419-427, 1996.

- VAN DAMME, E. J. M.; GOUSSAERT, S.; CHARELS, D.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. The mannose/maltose-specific Convolvulaceae lectins. **European Journal of Cell Biology**. v. 74, p. 7, 1997.
- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.
- VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Advances in Botanical Research**. v. 48, p. 107-209, 2008.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**. v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**. v. 183, n. 2, p. 258-262, 1991.
- VASCONCELOS, M. A.; ALVES, A. C.; CARNEIRO, R. F.; DIAS, A. H.; MARTINS, F. W.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 81, p. 600-607, 2015.
- VYSAKH, A.; ABHILASH, S.; KURIAKOSE, J.; MIDHUN, S. J.; JYOTHIS, M.; LATHA, M. S. Protective effect of Lour aquatic labeling against gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in Wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 106, p. 1188-94, 2018.
- WATANABE, Y.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. **Lectins of marine origin and their clinical applications**. In Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds. New York, NY, USA, 2013. p. 33-54.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. WHO, Geneva Switzerland. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy for containment of antimicrobial resistance**. WHO. 2001.
- XIMENES, N. C. A. **Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da vagem *Caesalpinia ferrea* (CfePL)**. 2009. 136 f. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2009.
- ZINNER, S. H.; GOLIKOVA, M. V.; STRUKOVA, E. N.; PORTNOY, Y. A.; FIRSOV, A. A. Predicting antibiotic combination effects on the selection of resistant *Staphylococcus aureus*: In vitro model studies with linezolid and gentamicin.

International Journal of Antimicrobial Agents. v. 52, n. 6, p. 854-860, 2018.