

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

Uso de lectinas nativas e recombinantes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*) no controle da formação de biofilme em cateter por isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases (KPC)

Daniela Rodriquero Wozeak

Pelotas, 2021

Daniela Rodriquero Wozeak

Uso de lectinas nativas e recombinantes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*) no controle da formação de biofilme em cateter por isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases (KPC)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Daiane Drawanz Hartwig

Coorientador: Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

W837u Wozeak, Daniela Rodriquero

Uso de lectinas nativas e recombinantes de pata-d-
-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e Banana
(*Musa acuminata*) no controle da formação de biofilme em
cateter por isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores
de carbapenemases (KPC) / Daniela Rodriquero Wozeak ;
Daiane Drawanz Hartwig, orientadora ; Amilton Clair Pinto
Seixas Neto, coorientador. — Pelotas, 2021.

59 f.

Dissertação (Mestrado) — Microbiologia e
Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal
de Pelotas, 2021.

1. Resistência bacteriana. 2. Controle de formação de
biofilme. 3. Proteínas recombinantes. 4. Carbapenêmicos.
I. Hartwig, Daiane Drawanz, orient. II. Seixas Neto, Amilton
Clair Pinto, coorient. III. Título.

CDD : 616.014

Daniela Rodriquero Wozeak

Uso de lectinas nativas e recombinantes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*) no controle da formação de biofilme em cateter por isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases (KPC)

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências biológicas, Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12 de julho de 2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Daiane Drawanz Hartwig (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcos Roberto Alves Ferreira
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Patrícia da Silva Nascente
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Thaís Larré Oliveira (Suplente)
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer minha família por todo apoio. Meus pais, sem eles eu não estaria concluindo essa etapa da minha vida. Obrigada pai e mãe, por me ouvirem, aconselharem e por serem tão presentes. Nem sempre foi fácil, mas vocês sempre tiveram uma palavra amiga, e principalmente muito amor, para me animar.

Ao meu noivo, Mateus, obrigada por estar sempre presente, por me acompanhar, ser meu porto seguro e acreditar em mim até nos momentos em que nem eu mesma acreditava. Obrigada por tornar dias difíceis e algumas lágrimas em palavras de carinho e vitórias, essa conquista não é só minha, é nossa.

À Prof. Daiane, mestre, orientadora e verdadeira amiga. Prof., obrigada pela oportunidade de fazer parte do LaBBio, por acreditar no meu potencial, pelas longas conversas, ensinamentos acadêmicos e sobre a vida, e em especial por tanta paciência em todos os momentos. Meu mais sincero e de coração, obrigada!

Stella, obrigada amiga! Obrigada por ser essa pessoa incrível, pelo apoio, incentivo, companheirismo e carinho. Ao amigo e coorientador, Amilton, obrigada pela ajuda, tempo dedicado, longas conversas, conselhos, incentivo e apoio. Sem vocês eu jamais conseguiria concluir minha pesquisa. Vocês são os melhores amigos que eu poderia ter.

Agradeço aos colegas do LaBBio pelo apoio, especialmente a Thayná, que sempre me auxiliou, apoiou e esteve por perto. Ao PPGMPar e a todos os docentes e técnico-administrativos, obrigada pela dedicação. Ao Professor Luciano e ao pessoal do Laboratório BioPro, que colaboraram com minha pesquisa.

Agradeço aos amigos, familiares e colegas que de alguma forma contribuíram para realização dessa conquista.

“Queria aproveitar esse momento e dizer a todas as garotas que sonham em ter a ciência como profissão: Vão em frente. É o melhor trabalho do mundo. E, se alguém disser a vocês que não podem, não deem ouvidos.”

Amy Farrah Fowler – The Big Bang Theory (T12E24)

Resumo

WOZEAK, Daniela Rodriguero. **Uso de lectinas nativas e recombinantes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*) no controle da formação de biofilme em cateter por isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases (KPC).** 2021. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Biofilmes são complexas comunidades microbianas que residem em uma matriz de exopolissacarídeos e se aderem a superfícies bióticas e abióticas. Em ambiente hospitalar, eles são normalmente a causa de infecções crônicas e infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) associadas a dispositivos médicos. O biofilme permite aos micro-organismos resistirem a condições adversas e estresse ambiental, incluindo o sistema imunológico do hospedeiro e a ação de antimicrobianos. Essa característica dificulta a terapêutica e justifica a busca por moléculas com ação de controle de formação de biofilme. Neste contexto, destacamos as lectinas, proteínas capazes de se ligar especificamente a carboidratos presentes na superfície da bactéria e desencadear sua ação. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de ação de controle na formação de biofilme por lectinas nativas e recombinantes, isoladas das plantas *Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata* e *Musa acuminata*, frente a isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases. Foram realizados diversos ensaios para avaliar a formação de biofilme pelos isolados, como o ensaio do Vermelho Congo, formação de biofilme *in vitro*, e padronização do método para avaliação da formação de biofilme em cateter, além de ensaios para avaliar a capacidade das lectinas no controle de formação de biofilme, como concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida. As lectinas demonstraram atividade bacteriostática e capacidade de reduzir a formação de biofilme em cateteres de uso hospitalar nos isolados avaliados. Os dados gerados nesse estudo sugerem que as lectinas têm potencial no desenvolvimento de uma formulação para controle da formação de biofilme, porém serão necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação, terapia combinada com antimicrobianos e estratégia terapêutica.

Palavras-Chave: resistência bacteriana; controle de formação de biofilme; proteínas recombinantes; carbapenêmicos.

Abstract

WOZEAK, Daniela Rodriguero. **Use of native and recombinant pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) and banana (*Musa acuminata*) lectins in the control of catheter biofilm formation by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) isolates**. 2021. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Biofilms are complex microbial communities that reside in a matrix of exopolysaccharides and adhere to biotic and abiotic surfaces. In the hospital environment, they are typically the cause of chronic infections and healthcare associated infections (HAI) associated with medical devices. Biofilm allows microorganisms to withstand adverse conditions and environmental stress, including the host's immune system and the action of antimicrobials. This characteristic makes therapy difficult and justifies the search for molecules with action to control biofilm formation. In this context, we highlight lectins, proteins capable of binding specifically to carbohydrates present on the surface of the bacteria and triggering their action. Thus, the objective of this work was to verify the potential of control action on biofilm formation by native and recombinant lectins, isolated from the plants *Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata* and *Musa acuminata*, against *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases. Several tests were carried out to evaluate biofilm formation by the isolates, such as the Congo Red test, in vitro biofilm formation, and standardization of the method for evaluating biofilm formation in catheters, as well as tests to assess the ability of lectins in control of biofilm formation, as minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. The lectins demonstrated bacteriostatic activity and the ability to reduce biofilm formation in hospital-use catheters in the evaluated isolates. The data generated in this study suggest that lectins have potential in the development of an antibiofilm formulation, but further studies will be needed to elucidate the mechanisms of action, combination therapy with antimicrobials and therapeutic strategy.

Keywords: Bacterial resistance; biofilm formation control; recombinant proteins; carbapenems.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Sequência de etapas de formação do biofilme bacteriano.....23
- Figura 2 - Infecções por biofilme em superfícies bióticas e abióticas. À esquerda (azul) exemplo de dispositivos médicos passíveis de contaminação, à direita (vermelho) exemplos de infecções por biofilme em tecidos biológicos humanos. Figura adaptada.....24
- Figura 3 - Placa de 24 cavidades de poliestireno com corpos de prova submersos em caldo BHI de forma que ficassem suspensos nos poços. Em destaque à esquerda o corpo de prova completo.....31
- Figura 4 - Teste do Ágar Vermelho Congo. A: colônias com coloração rosada, indicando cepa não formadora de biofilme. B: colônias negras, indicando cepa formadora de biofilme.....35
- Figura 5 - Placa de microdiluição com formação de biofilme corada com cristal violeta. A: controle positivo para formação de biofilme; B: controle negativo para formação de biofilme; C: área teste com isolados hospitalares.....36
- Figura 6 - Quantificação de biofilme para quatro isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase (KPC) e cepa padrão ATCC® 700603. O biofilme formado em placas de poliestireno foi corado com cristal violeta e quantificado por leitura de OD_{540nm}. Resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes, analisados por one-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett's. **** $p < 0.0001$ comparada com cepa padrão ATCC® 700603 (não formadora de biofilme).....37
- Figura 7 – Curva de crescimento padrão para *K. pneumoniae* ATCC® 700603 em condições laboratoriais, onde a curva traçada foi feita com base na determinação de células viáveis (contagem em meio sólido).....38
- Figura 8 - Representação gráfica para o teste de desprendimento de biofilme utilizando 4 métodos em cepa ATCC® 700603. Os testes foram realizados

em triplicata e submetidos a teste ANOVA seguido de teste T, valor de $p < 0,05$. Valores representados em UFC/mL.....39

Figura 9 - Representação gráfica da capacidade inibitória de formação de biofilme de lectinas nativas e recombinantes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*) (MIC 1 mg/mL) em cepas *K. pneumoniae*. Os dados são apresentados como a média $\pm$ DP para cada tratamento. A significância foi determinada por análise de variância (teste de comparações múltiplas de Dunnett). Os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições.....41

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para identificação da espécie, genes ligados a formação de biofilme e produção de carbapenemase em isolados de <i>K. pneumoniae</i>	29
Tabela 2 - Pesquisa de genes relacionados a formação de biofilme pela técnica de PCR em isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> carbapenemase.....	34
Tabela 3 - Relação de resultados para o teste de formação de biofilme em Ágar Vermelho Congo e em microplaca de poliestireno por isolados de <i>K. pneumoniae</i>	36
Tabela 4 - Média de contagens de colônias de <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} após 24h, 48h e 72h de incubação, expressas em UFC/mL.....	38

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Objetivos.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específico.....	16
2.3 Hipótese.....	16
3 Revisão da Literatura.....	18
3.1 Família <i>Enterobacteriaceae</i> e o gênero <i>Klebsiella</i>	18
3.2 Mecanismos de resistência.....	19
3.3 Biofilmes bacterianos.....	21
3.4 Ação terapêutica das lectinas: Ação de controle da formação de biofilme.....	25
4 Metodologia	28
4.1 Obtenção das amostras.....	28
4.2 Identificação de <i>K. pneumoniae</i> do tipo KPC e avaliação de genes relacionados a formação de biofilme.....	28
4.3 Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i>	28
4.3.1 Teste do Ágar Vermelho Congo.....	29
4.3.2 Ensaio da produção de biofilme.....	30
4.3.3 Padronização do método de produção de biofilme em cateter venoso.....	31
4.4 Ação antibacteriana e controle da formação de biofilme das lectinas.....	32
4.4.1 Obtenção das lectinas.....	32
4.4.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	32
4.4.3 Avaliação da atividade de controle da formação de biofilme das lectinas.....	33
5 Resultados.....	34
5.1 Identificação de <i>K. pneumoniae</i> do tipo KPC e avaliação de genes relacionados a formação de biofilme.....	34
5.2 Formação de biofilme em Ágar Vermelho Congo.....	35

5.3 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno.....	35
5.4 Padronização do método de avaliação da formação de biofilme em cateter.....	37
5.5 Efeito de controle da formação de biofilme das lectinas.....	39
6 Discussão.....	42
7 Conclusão.....	48
Referências.....	49

1 Introdução

Cateteres são dispositivos médicos que podem ser considerados como a mais relevante forma de acesso para os micro-organismos, facilitando a aquisição de infecções e a intensa proliferação destes pode atingir a corrente sanguínea (RIBEIRO *et al.*, 2019). A família *Enterobacteriaceae* caracteriza-se por sua capacidade de transmissão e aderência, invasão de células e tecidos, toxigenicidade e capacidade de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e o gênero *Klebsiella* vem ganhando atenção das organizações de saúde devido a essas características e o aumento do número de cepas que vem desenvolvendo resistência a diversos antimicrobianos (BENGOCHEA; SA PESSOA, 2019).

À medida que terapias com antimicrobianos se tornaram menos eficazes devido ao aumento da resistência microbiana, métodos alternativos e novas moléculas para combater doenças infecciosas são urgentemente necessários (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013). Parte dessa resistência está associada à formação de uma comunidade microbiana séssil denominada biofilme, essa estrutura confere resistência aos tratamentos até 1000 vezes maior quando comparado ao estado planctônico da mesma espécie, essa estratégia está associada a cerca de 80% das infecções crônicas (JAMAL *et al.*, 2018; LI; LEE, 2017).

O controle de formação de biofilme e o tratamento de biofilmes já formados permanece uma questão a ser enfrentada. Há poucas opções terapêuticas disponíveis na prática clínica para o controle de bactérias em biofilmes. Por esse motivo, pesquisadores investem em estratégias para solucionar infecções por biofilmes, principalmente buscando por tratamentos capazes de interferir na formação de biofilme (RABIN *et al.*, 2015; VUOTTO; DONELLI, 2019). Na busca por novos compostos que tenham ação na formação de biofilme, alguns estudos vem relatando diversos tipos de moléculas que se destacam por sua ação como, óleos essenciais (LOU *et al.*, 2017), peptídeos (HANEY *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2021), polissacarídeos (MCCARTHY *et al.*, 2019) e lectinas (PROCÓPIO *et al.*, 2017).

Lectinas são um grande grupo heterogêneo de proteínas de origem ubíqua na natureza e com capacidade de ligar-se reversivelmente a carboidratos, possibilitando diversas atividades biológicas como atividade antioxidante, anticâncer e ainda, pode haver interação das lectinas com a parede celular de bactérias e seus glicanos extracelulares, tal atividade possibilita a pesquisa de possíveis estratégias para inibição, ou controle, da formação de biofilme (ESTRADA-MARTÍNEZ *et al.*, 2017; MBAE; UMESHA; MANUKUMAR, 2018; POIROUX *et al.*, 2017).

Embora algumas lectinas não tenham efeito direto contra o micro-organismo, essas proteínas podem combater os biofilmes bacterianos, por exemplo, evitando sua formação (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2019), também podem alterar a viabilidade celular, interagir com os constituintes presentes na matriz exopolimérica do biofilme interrompendo a polimerização e os sinais de *quórum-sensing* (FERREIRA *et al.*, 2018).

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e controle da formação de biofilme por lectinas nativas e recombinantes das plantas *Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata* e *Musa acuminata* frente a isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases (KPC).

2.2 Específico

- Identificar em isolados de *Klebsiella* spp. o gene *bla_{KPC}* associado a produção de carbapenemases do tipo KPC;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme nos isolados através de método quantitativo, fenotípico e molecular na identificação de genes fimbriais (*fimH*, *fimA* e *mrkD*), capsulares (*rmp* e *wabG*) e de adesina (*ecpA*);
- Estabelecer e padronizar um método de avaliação da formação de biofilme em cateter hospitalar *in vitro* por isolados clínicos *K. pneumoniae* do tipo KPC;
- Verificar a ação bactericida/bacteriostática e potencial controle da formação de biofilme das lectinas nativas ou recombinantes obtidas a partir das plantas comumente conhecidas como pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*).

2.3 Hipótese

Visto que há estudos que relatam diversas interações biológicas entre lectinas e bactérias, a hipótese estabelecida é que as proteínas utilizadas no presente estudo

terão ação bactericida/bacteriostática e controle da formação de biofilme frente aos isolados estudados.

3 Revisão da literatura

3.1 Família *Enterobacteriaceae* e o gênero *Klebsiella*

Os membros da família *Enterobacteriaceae* estão entre os principais agentes de infecção relacionados à assistência à saúde (IRAS), definidas como qualquer processo infeccioso adquirido em estabelecimentos destinados a saúde como hospitais, ambulatorios, unidades de saúde entre outras (SYDNOR; PERL, 2011), principalmente entre indivíduos imunocomprometidos. As enterobactérias são a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância médica, caracterizadas por ter formato bacilar, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, são anaeróbios facultativos, fermentam glicose, não tem exigências nutricionais, e são frequentemente associadas a infecções na comunidade, além de IRAS (ANVISA, 2004).

Várias espécies dessa família estão associadas à quadros de doença, como abscessos, meningites, sepses, pneumonias, infecções do trato urinário, infecções gastrointestinais e colonização de cateteres (KONEMAN et al., 2001) e ainda, podemos citá-las dentre as bactérias Gram-negativas de maior relevância epidemiológica. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2004) relata que as enterobactérias representam 80% ou mais de casos de bactérias Gram-negativas de importância clínica, isoladas na rotina microbiológica e ainda, responsáveis por cerca de 70% dos casos de infecções urinárias e 50% dos casos de septicemia. Dentro do grupo, podemos destacar os gêneros *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. com maior importância clínica.

O gênero *Klebsiella* é composto por 24 espécies e 8 subespécies (LPSN, 2021) com algumas de importância como agentes etiológicos de infecções hospitalares e, o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, produz pressão seletiva que favorece a proliferação de cepas multirresistentes (CANDAN; AKSÖZ, 2015). *Klebsiella* spp. apresentam cápsula polissacarídica e pili, estruturas que

auxiliam na sua aderência às mucosas do trato respiratório e geniturinário do hospedeiro, locais comuns de infecção em humanos (RYAN et al., 2010). Além disso, são caracterizadas por serem tanto aeróbias quanto anaeróbias, podendo ser anaeróbias facultativas, não produzem esporos, fermentam lactose, são positivas para catalase e pouco exigentes nutricionalmente (MURAY, 2014). As principais espécies representantes deste gênero são *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* e *K. ozaenae*.

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é encontrada na natureza, incluindo água, solo e animais, ainda podem colonizar dispositivos médicos, superfícies e ambientes de saúde (BENGOCHEA; SA PESSOA, 2019). São consideradas patógenos oportunistas, que no homem colonizam superfícies mucosas sem causar patologias, no entanto, a partir da mucosa podem se disseminar para outros tecidos, causando infecções com risco de morte (PACZOSA; MECSAS, 2016). *K. pneumoniae* é uma das enterobactérias mais comuns envolvidas em casos de IRAS, como septicemia, pneumonia e infecção do trato urinário, infecções do sítio cirúrgico e infecção relacionada ao uso de cateter (LIU et al., 2018).

3.2 Mecanismos de resistência

Durante os últimos 3,5 - 3,7 bilhões de anos, a vida superou todos os desafios que sofreu devido a sua extraordinária capacidade de mudar e se adaptar. Os micro-organismos são a forma de vida mais numerosa em nosso planeta, e têm demonstrado grande flexibilidade e podem ser encontrados em todos os ambientes. Seu alto número de populações, sua incrível plasticidade genômica e sua capacidade de trocar informações genéticas entre espécies distintas, fornecem-lhes uma grande adaptabilidade e capacidade de resistir a situações adversas (RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2013).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um evento dinâmico e está diretamente relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, que resultam na resistência à ação dessas drogas. Esses genes podem fazer parte naturalmente da genética do micro-organismo, resultado de um mecanismo de autoproteção ou podem ser adquiridos por mutação ou transferência de material genético (SAUNDERS, 1984).

As espécies do gênero *Klebsiella* são conhecidas como um “reservatório” de genes de resistência aos antimicrobianos, que podem se disseminar para outras espécies. Poucas opções terapêuticas restam para pacientes infectados por *K. pneumoniae* multirresistente e, de forma alarmante, estudos recentes reconhecem que clones virulentos e multirresistentes têm acesso ao um *pool* móvel de genes de virulência antimicrobiana (HOLT *et al.*, 2015; LAM *et al.*, 2018). Essa interação permite o surgimento de cepas hipervirulentas, que podem causar infecções de difícil tratamento em indivíduos saudáveis (YAO *et al.*, 2018).

Segundo Kumar & Varela (2013), o exemplo clássico de mecanismo de resistência a antimicrobianos é a produção da β -lactamase, enzima que hidrolisa o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. Produzida por muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, há mais de 200 tipos de β -lactamase pertencentes a diferentes grupos funcionais, podendo ter origem cromossomal ou plasmidial. Outros mecanismos de resistência muito comuns são: alteração do local-alvo onde atua determinado antimicrobiano, o que impede a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida e a resistência por bomba de efluxo, onde a bactéria impede a ação adequada do antimicrobiano por meio de bombeamento ativo do meio intracelular para o extracelular (ANVISA, 2007).

K. pneumoniae produtora de carbapemase (KPC) é uma bactéria resistente a múltiplas drogas, podendo ser classificada como *Multidrug-resistant* (MDR) quando a cepa é resistente a um ou mais antimicrobianos de três ou mais classes, *Extensively drug-resistant* (XDR) quando a cepa é resistente a um ou mais antimicrobianos de todas as classes, exceto uma ou duas (HORCAJADA *et al.*, 2019), e por fim, *Pandrug-resistant* (PDR) quando há resistência a todos os antimicrobianos testados (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020), essa característica eleva os custos de tratamento e reflete em uma alta taxa de mortalidade (SYDNOR; PERL, 2011). A enzima KPC foi identificada pela primeira vez nos Estados Unidos, no ano de 1996, em uma cepa de origem hospitalar de *K. pneumoniae*. Rapidamente a enzima passou a ser identificada em enterobactérias em diversos outros países como Colômbia, China, Israel e Grécia. No Brasil, há relatos de que a KPC foi identificada pela primeira vez em 2006 na cidade de Recife, PE, e o primeiro surto de IRAS ocorreu em 2009, mas foi notificado apenas em 2011 (BEIRÃO *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por Marçal *et al.* (2020), os autores fizeram um levantamento de referências reunindo dados epidemiológicos relacionados à prevalência de isolados de *K. pneumoniae* KPC de 2006 à 2016 nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul do Brasil, revelando que a região com maior prevalência de isolados é a região Sul, com 2.423 isolados, seguido do Centro-oeste (877 isolados) e Sudeste (403 isolados), ainda descreve que a fonte de isolamento mais frequente é a coleta de urina e o estado com maior incidência de casos é Santa Catarina (49,94%). No mesmo estudo foram apontados os antimicrobianos que os isolados apresentam maior resistência e sensibilidade, essa relação também foi dividida por estado. Sendo assim, no Centro-oeste os isolados apresentaram maior resistência ao ertapenen, seguido do meropenen e maior sensibilidade a amicacina, já na região sudeste os isolados foram mais susceptíveis ao ertapenen e mais sensíveis a gentamicina, assim como na região Sul o ertapenen também foi o antimicrobiano que os isolados tiveram maior resistência e a fosfomicina mais sensíveis.

Nos últimos anos tornou-se claro que o uso intensivo de antimicrobianos por um longo período na saúde humana, veterinária e na agricultura, provocaram a seleção e disseminação de bactérias patogênicas altamente resistentes (RODRÍGUEZ-ROJAS *et al.*, 2013). Ainda, com o passar dos anos essa resistência aos antimicrobianos também tem sido atribuída a outros mecanismos, como os biofilmes, que protegem a comunidade bacteriana e minimizam a ação dos antimicrobianos, desinfetantes e antissépticos.

3.3 Biofilmes bacterianos

Um modo de resistência, apto a ocorrer em diversos ambientes e capaz de proteger contra a entrada de múltiplos agentes antimicrobianos são os biofilmes. Essa matriz polimérica extracelular, é capaz de se aderir a diversos materiais, incluindo dentes, feridas traumáticas, cateteres médicos, bancadas, superfícies de materiais metálicos, mãos e até mesmo superfície de fluídos (KUMAR; VARELA, 2013). Os biofilmes estão se tornando cada vez mais um desafio na área da medicina clínica humana, por reduzir ou anular o potencial quimioterápico de antimicrobianos, diminuindo a qualidade de tratamento dos pacientes e elevando custos (KUMAR; VARELA, 2013).

A primeira teoria conhecida de como ocorre a formação de biofilme foi descrita por Marshall *et al.* (1971). Ela estabelecia que a formação de biofilme se daria em duas etapas: primeiramente a adesão reversível, uma vez que as interações entre micro-organismo e superfície são por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorreria a interação física com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzida pela bactéria, sendo denominada matriz de glicocálix. Uma outra teoria, mais detalhada, sugere que a formação do biofilme se dá ao longo de diversas etapas e ressalta que para haver essa adesão de micro-organismos e logo a formação do biofilme em tal superfície, é necessário que haja uma interação iônica entre a bactéria e o substrato (RICHARDS *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2017) (Figura 1).

1) Primeiramente ocorre a adesão das células bacterianas ao substrato, formando o filme condicionante (WATNICK, 2000), na área da saúde essa adesão pode ocorrer em superfícies inertes como bancadas, bisturis, luvas e dispositivos médicos, ou ocorrer em material orgânico, como mucosas e ferimentos do paciente;

2) Na sequência acontece a agregação e fixação de novas células ao meio (WATNICK, 2000), que ocorre em dois estágios, adesão reversível seguida de adesão irreversível (IST, 2008). A adesão reversível é caracterizada pela interação fraca entre a bactéria e substrato, envolvendo forças de atração de Van Der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, nesse estágio as células bacterianas ainda podem ser removidas pela aplicação de forças mínimas (WATNICK, 2000). A adesão irreversível se dá quando há o ancoramento de apêndices, como pili, flagelo, adesinas e/ou produção de substâncias poliméricas extracelulares, provocando o fortalecimento das interações químicas entre células bacterianas e a superfície de contato (IST, 2008), essas interações levam pouco tempo para ocorrer (de 20 minutos a 4 horas após o contato) e caracterizam-se por ligações químicas dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (HOOD; ZOTTOLA, 1995);

3) Multiplicação das células bacterianas presentes na estrutura do biofilme, formando microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares (OLIVIERA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010) logo, ocorre a adesão de outros micro-organismos colonizadores secundários (IST, 2005);

4) E finalmente o desprendimento de células únicas ou fragmentos (COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005).

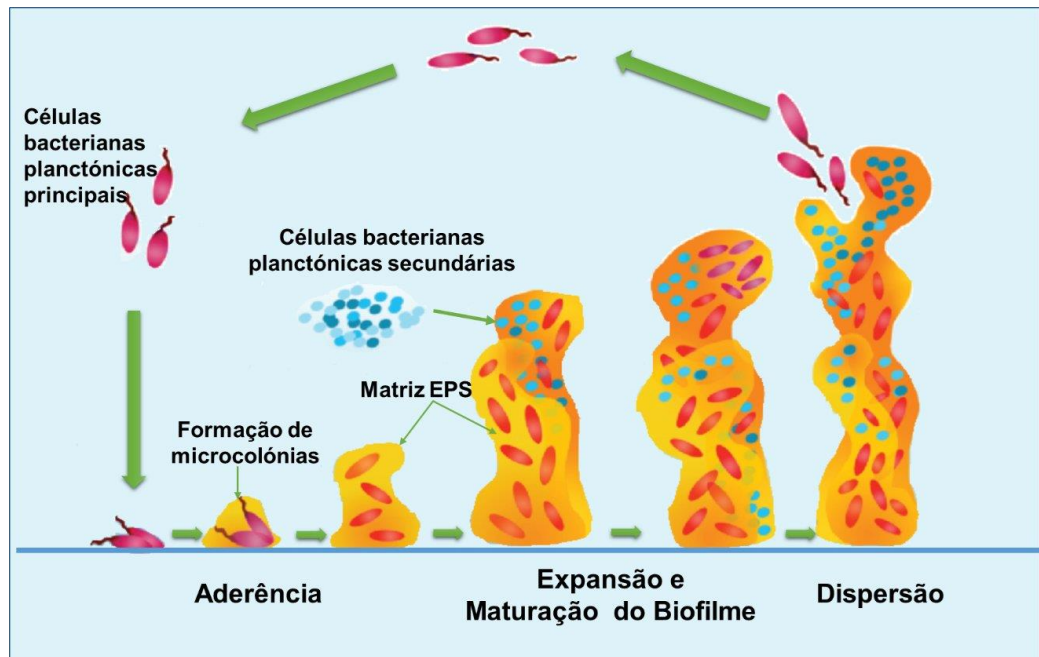


Figura 1 – Sequência de etapas de formação do biofilme bacteriano (Food Safety Brazil)

Nos últimos anos as infecções humanas (Figura 2) provocadas por biofilmes, vem estimulando as pesquisas em busca de compostos controle da formação de biofilme (RABIN *et al.*, 2015). Em ambientes hospitalares, o biofilme está frequentemente associado às infecções crônicas, pois resistem ao sistema imune do hospedeiro, tornando-as de difícil tratamento e ainda acabam por elevar as taxas de resistência a antimicrobianos e desinfetantes (CANTÓN; MOROSINI, 2011). Estima-se que cerca de 65-80% das infecções relacionadas a dispositivos invasivos estejam associadas à presença de biofilmes bacterianos. Ainda, os biofilmes constituem o principal fator de risco para as infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) (SYDNOR; PERL, 2011).

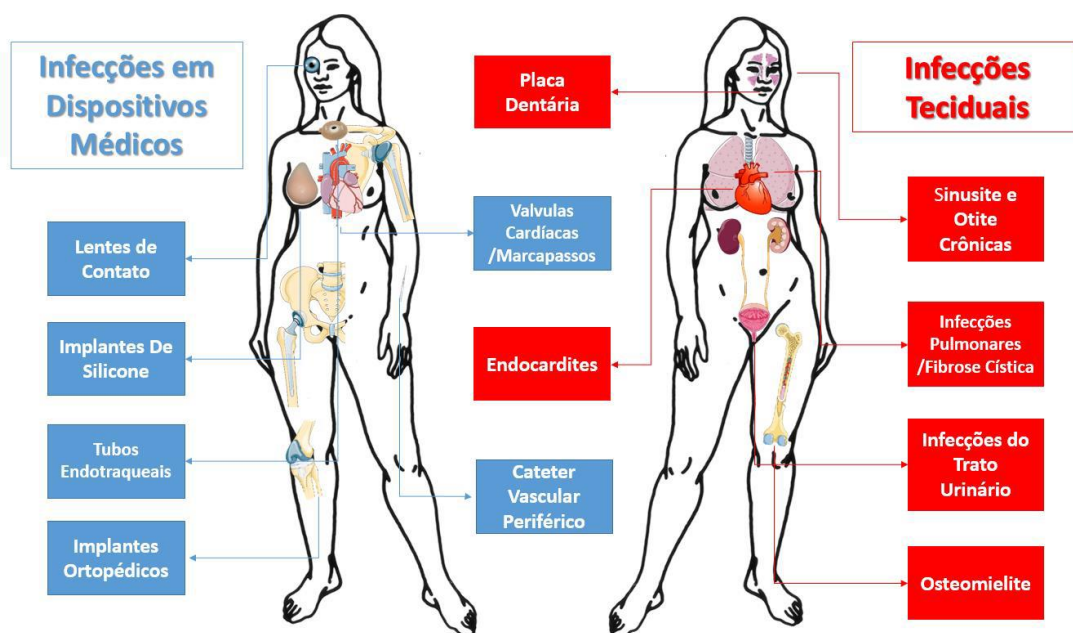


Figura 2 – Infecções por biofilme em superfícies bióticas e abióticas. À esquerda (azul) exemplo de dispositivos médicos passíveis de contaminação, à direita (vermelho) exemplos de infecções por biofilme em tecidos biológicos humanos. Figura adaptada. (LEBEAUX *et al.*, 2013).

A formação de biofilme tem uma relação direta com a habilidade do micro-organismo de colonizar o cateter (STICKLER, 2014), e o tempo necessário para que ocorra a formação dependerá da espécie bacteriana e do tipo e material que o dispositivo é composto (DOHNT *et al.*, 2011; STICKLER, 2014). Em geral, os micro-organismos mais comumente associados ao biofilme de cateter são: *E. coli*, *Enterococcus sp.*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae* (STICKLER, 2014). Essas espécies se aderem à superfície do cateter e inicia-se a secreção de material viscoso (exopolissacarídeo), que confere às células microbianas uma elevada resistência a antimicrobianos, bem como, aumenta a possibilidade de transferência horizontal de genes entre bactérias dentro do biofilme, ainda confere resistência contra o sistema imune do hospedeiro e contra desinfetantes e antissépticos (NICOLLE, 2014; VERMA *et al.*, 2016).

Biofilmes desempenham um papel importante na patogênese em ambientes hospitalares, sendo assim é necessária a pesquisa quantitativa e molecular de isolados bacterianos dessa origem. A investigação a respeito desse meio de resistência irá fornecer dados para pesquisa de antimicrobianos mais efetivos, bem como, alertar sobre as boas práticas em assistência a saúde e ainda, melhorar a qualidade de permanência com dispositivos implantáveis.

3.4 Ação terapêutica das lectinas: Ação de controle da formação de biofilme

Em 1954, os cientistas Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina, que deriva do latim *legere* e significa ‘selecionar’, esse termo foi baseado no fato de que essas proteínas têm capacidade de distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos, habilidade conhecida na época. Desde então, várias características seguiram sendo exploradas e, hoje em dia, várias são descritas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

As lectinas são ubíquas na natureza e com alta diversidade e especificidade para diferentes carboidratos, podem ser encontradas em todos os organismos eucarióticos e em várias espécies de vírus e bactérias. A grande maioria já caracterizada é proveniente de plantas (TEIXEIRA *et al.*, 2012), isoladas principalmente de sementes (HAMILTON *et al.*, 2021), fruto (JIMÉNEZ *et al.*, 2017), folhas (OLIVEIRA *et al.*, 2020), flores (BÜKER; ADNAN, 2021), bulbo, raízes, entre outras, essas lectinas tem papel essencial na defesa, atuam na atividade fisiológica, química, molecular e celular das plantas (INGALE; HIVRALE, 2013). Além de plantas, há descrição de lectinas isoladas em animais, insetos, fungos, vírus e bactérias (INGALE; HIVRALE, 2013).

As lectinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas, não imunes, caracterizadas pela presença de um sítio de reconhecimento de carboidratos (CDR – carbohydrate-recognition domain), e por meio de forças intermoleculares (pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica e eletrostática) interagem reversivelmente com glicanos com alta especificidade e afinidade, sem alterar a estrutura covalente do açúcar. Essa característica pode mediar diversos eventos biológicos, onde há necessidade de reconhecimento proteína/carboidrato, como na comunicação celular, defesa contra invasores, inflamações, entre outras (HAMID *et al.*, 2013; INGALE; HIVRALE, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2012; VAN HOLLE *et al.*, 2017).

Nos mecanismos de defesa contra invasores, a atividade bacteriana é uma ação associada ao sistema de defesa do organismo hospedeiro, e as lectinas agem no reconhecimento específico de carboidratos presentes na superfície celular do micro-organismo, essa interação pode inibir o crescimento, desenvolvimento, a mobilidade e ainda, causar alterações estruturais na bactéria como permeabilidade de membrana e potencial de adesão (BREITENBACH BARROSO COELHO *et al.*, 2018;

CHEN, C. S. *et al.*, 2018). A presença do CDR permite interações cruzadas entre bactérias, ocorrendo a aglutinação e posteriormente a imobilização do grupo. A aglutinação é um meio de defesa contra patógenos, prevenindo sua dispersão e ainda reduz a aderência em superfícies bióticas e/ou abióticas, essa característica promove a redução/inibição na formação de biofilme (DE MELO *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2014).

As pesquisas com lectinas no controle da formação de biofilme estão evoluindo e a busca por diferentes fontes dessas lectinas também vem sendo aplicada. O uso de plantas conhecidamente com ação medicinal são um excelente alvo para pesquisa de suas moléculas. De acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (2020), o gênero *Bauhinia* está incluído na família Fabaceae, subfamília Cercidae e conta com cerca de 300 espécies (VAZ & TOZZI, 2005) bastante difundidas no Brasil, apresentando várias denominações populares, como: pata-de-vaca, unha-de-vaca, unha-de-boi, mororó, entre outras, devido ao formato de suas folhas (NOGUEIRA & SABINO, 2012). Dentre as espécies que o compõe, destacam-se a *Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*, plantas muito conhecidas e tradicionalmente utilizadas por suas propriedades medicinais (AZEVEDO *et al.*, 2006) como as ações anti-câncer, antioxidante, tratamento para diabetes, úlcera, entre outros (SINGH; SINGH; PABLA, 2019). *B. variegata* é comumente conhecida na medicina oriental chinesa e indiana e é usada para tratamentos de úlcera e doenças de pele (adstringente e tônico), assim como é utilizada em doenças inflamatórias, tem ação antibacteriana, antioxidante e atividade anticancerígena, e existem relatos de que suas raízes são usadas como antídoto para picadas de algumas cobras (MOHSIN; AKHTAR, 2017; SHARMA, N. *et al.*, 2019). A *B. forficata* vem sendo estudada e utilizada principalmente em tratamentos de diabetes (KRISTIANE; MAXIM; IRES, 2020; SINGH; SINGH; PABLA, 2019) bem como em tratamento de doenças cardiovasculares (CECHINEL-ZANCHETT *et al.*, 2019).

A família Musaceae é composta por três gêneros, *Musa*, *Ensete* e *Musella*. *Musa* é o maior grupo, com cerca de 35 espécies, e é popularmente conhecida como banana. A banana é uma excelente fonte de nutrição e faz parte de uma dieta bem balanceada para pessoas de todas as idades. Além de fonte nutritiva, a banana tem diversos benefícios medicinais como atividade anti-hipertensiva, antioxidante,

antilipêmico, anticâncer, antiviral, antifúngica, antimicrobiana e até mesmo ação em doenças neurológicas, entre outras (JYOTHIRMAYI; RAO, 2015).

A necessidade de novas moléculas com ação frente a bactérias é uma realidade para a ciência, e a pesquisa dessas biomoléculas com potencial antimicrobiano e com diferentes mecanismos de ação beneficia não somente a população com relação ao bem-estar e saúde, mas também a ciência. Explorar as propriedades antibacterianas e controle da formação de biofilme de lectinas favorece um novo repertório de possíveis aplicações medicinais e biotecnológicas.

4 Metodologia

4.1 Obtenção das amostras

Os 34 isolados de *Klebsiella* spp. utilizados pertencem a bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, alocado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Estes isolados foram cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas, entre outubro de 2015 e maio de 2017. A identificação foi feita por VITEK®, e estes isolados foram armazenados a -20°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com glicerol 10%.

4.2 Identificação de *K. pneumoniae* do tipo KPC e avaliação de genes relacionados a formação de biofilme

Para confirmação da espécie *K. pneumoniae*, foi utilizada a técnica de PCR para amplificação do gene espécie-específico *dnaA* (DE CAMPOS *et al.*, 2016). Primeiramente, foi realizada a extração do DNA genômico pelo método de fervura a partir de uma cultura pura, sendo suspendidas de 2 a 3 colônias em 100 µL de água Milli-Q em microtubos (VANEECHOUTTE *et al.*, 1995). Essas suspensões foram submetidas à fervura por 15 minutos, seguido de choque térmico em banho de gelo por 15 minutos. O conteúdo de cada microtubo foi homogeneizado cuidadosamente e analisado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5x, a fim de avaliar integridade e qualidade do DNA. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

O DNA genômico extraído foi utilizado em reações de PCR para detecção de sequências genômicas de interesse, como genes relacionados a produção de carbapenemase tipo KPC (*bla_{KPC}*) (DE CAMPOS *et al.*, 2016), genes relacionados a virulência, como fimbriais (*fimA*, *mrkD* e *fimH*) (ALCÁNTAR-CURIEL *et al.*, 2013; DE CAMPOS *et al.*, 2016; STAHLHUT *et al.*, 2009), capsulares (*wabG* e *rpmA*) (CHEN,

Z. *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2007) e para adesina (*ecpA*) (ALCÁNTAR-CURIEL *et al.*, 2013) (Tabela 1). Cada reação foi preparada com 13 µL de Go Taq Colorless Master Mix (Promega, EUA), 1 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 5 µL de DNA genômico e 5 µL de água ultrapura, completando 25 µL. As condições de amplificação foram: 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 30 s, 72°C por 1 min e 72°C por 7 min.

Tabela 1 - Sequências dos *primers* utilizados para identificação da espécie, genes ligados a formação de biofilme e produção de carbapenemase em isolados de *K. pneumoniae*.

Genes	Primers	Sequência nucleotídica 5'-3'	
<i>dnaA</i>	<i>dnaA</i> -for	TGCCAAGCGACTGCGCTCAA	Espécie-específico
	<i>dnaA</i> -rev	AGCTCTTTGGCCAGCGCCAT	
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{KPC}</i> -for	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG	Carbapenemase (KPC)
	<i>bla_{KPC}</i> -rev	GTTGACGCCCAATCCCTCGA	
<i>fimA</i>	<i>fimA</i> -for	CGGACGGTACGCTGTATTTT	Biofilme (pili tipo 1 e 3)
	<i>fimA</i> -rev	GCTTCGGCGTTGTCTTTATC	
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -for	CACGCAAGGCACCATTC	Biofilme (pili tipo 1 e 3)
	<i>fimH</i> -rev	GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	
<i>rmp</i>	<i>rmp</i> -for	GCAGTTAACTGGACTACCTCTG	Biofilme (cápsula polissacarídica)
	<i>rmp</i> -rev	GTTTACAATTCGGCTAACATTTTCTTTAAG	
<i>ecpA</i>	<i>ecpA</i> -for	GCA ACA GCC AAA AAA GAC ACC	Biofilme (Adesina)
	<i>ecpA</i> -rev	CCA GGT CGC GTC GAA CTG	
<i>mrkD</i>	<i>mrkD</i> -for	TTGTTGCTGCTGGTTTGGTTC	Biofilme (pili tipo 1 e 3)
	<i>mrkD</i> -rev	CGAGTTTCCTGGCTTTGTAATG	
<i>wabG</i>	<i>wabG</i> -for	CGG ACT GGC AGA TCC ATA TC	Biofilme (cápsula polissacarídica)
	<i>wabG</i> -rev	ACC ATC GGC CAT TTG ATA GA	

4.3 Capacidade de formação de biofilme *in vitro*

4.3.1 Teste do Ágar Vermelho Congo

Foi realizada a caracterização fenotípica da produção de biofilme, através do Teste do Ágar Vermelho Congo (FREEMAN *et al.*, 1989). Para tal, foi utilizado Caldo Müller-Hinton acrescido de 1% de ágar-ágar, 5% sacarose e 0,08% de corante Vermelho Kongo. Após esterilização, o meio foi disposto em placas de Petri e os isolados foram inoculados por esgotamento e incubados por 24h em estufa a 36°C.

Passado o tempo de incubação as placas foram retiradas da estufa e deixadas em temperatura ambiente por mais 18h e logo se observou a presença de colônias de coloração cinza ou vermelho escuro a negra, indicando positivo para produção de biofilme, a presença de colônias rosadas indicou resultado negativo para produção de biofilme.

4.3.2 Ensaio da produção de biofilme

Para os testes de formação do biofilme *in vitro* foram utilizadas placas de microdiluição estéreis de poliestireno de fundo chato com 96 poços (STEPANOVIC, 2001). Os isolados foram repicados em ágar *Brain and Heart Infusion* (BHI) (Kasvi ®) e incubados a 37°C, por 16-18h. Deste cultivo foi preparado um inóculo bacteriano, com auxílio de espectrofotômetro e de acordo com a escala 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml⁻¹). Logo, 20µl da suspensão foram transferidos para as placas de microdiluição (cada isolado bacteriano foi inoculado em quadruplicata) e foram adicionados 180µl de Caldo Triple Soy Broth (TSB) (Kasvi ®). Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 produtora de biofilme. Como controle negativo foi utilizada uma solução de NaCl 0,9% estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, após esse período, o conteúdo dos poços foi cuidadosamente descartado e a placa foi lavada com solução de NaCl 0,9% três vezes. Após, foram adicionados 150µl de metanol e mantido por 20 minutos, para fixação do biofilme. O metanol foi descartado e as placas permaneceram em temperatura ambiente por 16-18h para secagem, e então se adicionou 200mL de solução de Cristal Violeta 0,15%, durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após o descarte da solução de Cristal Violeta, as placas foram lavadas com solução de NaCl 0,9% estéril e foram adicionados 150µl de etanol 95% por 30 minutos. A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos foi lida com o auxílio de aparelho Espectrofotômetro POLARIS EE (Celer Biotecnologia S.A.) com comprimento de onda de 540nm. Para acompanhamento do crescimento bacteriano, foram feitas leituras na hora zero e após 24 horas de incubação, com comprimento de onda de 630nm.

A classificação das amostras quanto a capacidade de formar biofilme foi feita relacionando com a densidade óptica do controle negativo (DO_c), sendo assim, a classificação ficou da seguinte forma: $DO \leq DO_c$ não produtor de biofilme, $DO_c \leq DO$

$\leq 2 \times DO_c$ fraco produtor, $2 \times DO_c \leq DO \leq 4 \times DO_c$ produtor moderado, $DO \geq 4 \times DO_c$. (CHRISTENSEN et al. 1990).

4.3.3 Padronização do método de produção de biofilme em cateter venoso

A padronização deste método foi baseada em Peralta et al. (2015). Assim, as bactérias foram cultivadas em Ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi ®) e incubados à 37°C por 18-24h. A partir deste cultivo foi feita diluição na escala 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹) para preparo do inóculo. Os corpos de prova foram confeccionados em cateter venoso de tamanho 16G, com 1cm de comprimento, esterilizados e encaixados aos poços de placas com 24 cavidades de modo que ficassem suspensos em meio de cultivo (Figura 3). Com os corpos de prova suspensos, foram adicionados 1,8mL de caldo BHI seguidos de 200µl de inóculo bacteriano. O material foi incubado a 37°C em três diferentes tempos de incubação (24h, 48h e 72h), com objetivo de verificar se houve aumento quantitativo de biofilme.



Figura 3 – Placa de 24 cavidades de poliestireno com corpos de prova submersos em caldo BHI de forma que ficassem suspensos nos poços. Em destaque à esquerda o corpo de prova completo.

Para determinar o melhor método de desprendimento do biofilme, o cateter foi retirado do corpo de prova e inserido em microtubo com solução de NaCl 0,9% para que fossem avaliados 3 métodos: agitação em vórtex por 30 segundos, sonicação por 1 minuto à 120 Watts e 37°C, sonicação por 1 minuto seguido de agitação em vórtex

por 30 segundos e, para fins de controle, uma amostra sem nenhum método de desprendimento. Após aplicar o método de desprendimento, foram feitas diluições seriadas 1:10 até a ordem 10^{-7} , em seguida 10 µl foram retirados de cada microtubo e inoculados em placas contendo Ágar MacConkey, por método de espalhamento e levados a estufa por 16-18h à 37°C. Ao final do período de incubação foram verificadas as diluições com crescimento entre 30 e 300 colônias e feita a contagem, expressando-as em UFC/mL.

A distribuição normal foi verificada para todas as variáveis, aquelas que não atendiam aos pressupostos paramétricos foram transformadas em $\log_{10}$. Logo, para determinar o melhor método de desprendimento de biofilme para posterior contagem foram realizadas análises estatísticas, também, foi determinada uma curva de crescimento para determinar o melhor tempo de cultivo para a análise. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 6.1, utilizando Teste de Variância Simples (one-way ANOVA) seguido de teste de Dunnett's com nível de significância $p < 0,05$.

4.4 Ação antibacteriana e controle da formação de biofilme das lectinas

4.4.1 Obtenção das lectinas

Lectinas de plantas das espécies *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) (DA SILVA PINTO *et al.*, 2019), *Bauhinia variegata* (pata-de-vaca-lilás) (PINTO *et al.*, 2008) e *Musa acuminata* (banana) (DE CAMARGO *et al.*, 2020) foram utilizadas na forma nativa e recombinante, sendo cedidas pelo Laboratório de Bioinformática e Proteômica (BioPro), localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

4.4.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Para a determinação da CMI foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2015), utilizando o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Foram realizadas diluições das lectinas no meio variando de 0,125 a 2 mg/mL. Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo sem adição de inóculo, e como controle positivo meio de cultivo com a adição do inóculo bacteriano. Para controle de esterilidade das lectinas,

foi inoculada a solução de lectina em meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata e incubados a 37°C por 24h e, após a incubação, foram adicionados 10 µL do reagente resazurina a 0,02% em todas as cavidades da placa, a fim de verificar possível atividade antibacteriana.

Após a determinação da CMI, foi determinada a CMB, sendo semeada uma alçada de todas as cavidades que apresentarem inibição do crescimento, em placas contendo Ágar Muller-Hinton. Após a incubação, foi possível determinar quais concentrações das lectinas apresentaram atividade bactericida ou bacteriostática sobre os isolados testados (NCCLS, 2015).

4.4.3 Avaliação da atividade de controle da formação de biofilme das lectinas

O método utilizado foi baseado na padronização estabelecida no presente estudo para formação de biofilme em cateter. Sendo assim, as cepas foram cultivadas em Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi®), à 37°C por 18-24h. A partir deste cultivo foi feita diluição na escala 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹) para preparo do inóculo. Os corpos de prova foram confeccionados com cateter venoso de tamanho 16G, com 1cm de comprimento, esterilizados e encaixados aos poços de placas com 24 cavidades de modo que ficassem suspensos em meio de cultivo. Com os corpos de prova suspensos, foram adicionados 0,9mL de lectina diluída em Caldo BHI na concentração 1mg/mL, seguidos de 0,9ml de inóculo bacteriano. O material foi incubado a 37°C por 24h. Após o período de incubação o cateter foi retirado do corpo de prova e inserido em microtubo com solução de NaCl 0,9%, e submetido a agitação em vórtex por 30 segundos. Após aplicar o método de desprendimento, foram feitas diluições seriadas 1:10 até a ordem 10^{-7} e, em seguida, 10µl foram retirados de cada microtubo e inoculados em placas de Petri contendo Ágar MacConkey por método de espalhamento, e levados a estufa por 16-18h à 37°C. Ao final do período de incubação foram verificadas as diluições com crescimento, feita a contagem de colônias, expressando-as em UFC/mL. Os dados foram analisando utilizando o software GraphPad Prism 6.1, utilizando Teste de Variância Simples (one-way ANOVA) seguido de teste de Dunnett's com nível de significância $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Identificação de *K. pneumoniae* do tipo KPC e avaliação de genes relacionados a formação de biofilme

Foram analisados 34 isolados clínicos provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, coletados no período de outubro de 2015 a maio de 2017. Do total de amostras, 25 (73,53%) foram confirmadas como da espécie *K. pneumoniae*, através da amplificação do gene espécie-específico *dnaA*. Destes isolados, 12 (48%) apresentaram o gene *bla_{KPC}*. Quatro (4) isolados *K. pneumoniae* KPC (KPC4, KPC6, KPC9 e KPC11), mais a cepa padrão de *K. pneumoniae* ATCC® 700603, foram selecionados para a pesquisa de genes relacionados a formação de biofilme e para os testes de formação de biofilme, atividade antibacteriana e controle da formação de biofilme das lectinas *in vitro*.

Em nosso estudo, todos os isolados utilizados apresentaram ao menos um gene buscado, das 5 cepas, 3 (60%) amplificaram o gene *fimA* e *fimH*, 2 (40%) amplificaram o gene *ecpA*, 3 (60%) amplificaram o gene *wabG* e nenhuma cepa amplificou os genes *rmpA* e *mrkD* (Tabela 2).

Tabela 2 - Pesquisa de genes relacionados a formação de biofilme pela técnica de PCR em isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC.

Gene/Isolado	ATCC® 700603	KPC4	KPC6	KPC9	KPC11
<i>fimA</i>	+	+	-	+	-
<i>fimH</i>	-	+	+	-	+
<i>rmpA</i>	-	-	-	-	-
<i>ecpA</i>	-	-	-	+	+
<i>mrkD</i>	-	-	-	-	-
<i>wabG</i>	-	+	+	-	+

+: presença do gene; -: ausência do gene; KPC: denominação dada aos isolados clínicos.

5.2 Formação de biofilme em Ágar Vermelho Congo

O Teste do Ágar Vermelho Congo foi feito para fins de avaliação fenotípica da produção de biofilme nos quatro isolados de *K. pneumoniae* do tipo KPC selecionados. Cepas que apresentaram colônias de coloração rosada foram consideradas negativas, as cepas que apresentaram colônias de coloração negra foram consideradas positivas para formação de biofilme (Figura 4). Neste teste, todos os isolados testados no Ágar Vermelho Congo tiveram colônias fenotipicamente positivas para formação de biofilme (Tabela 3).

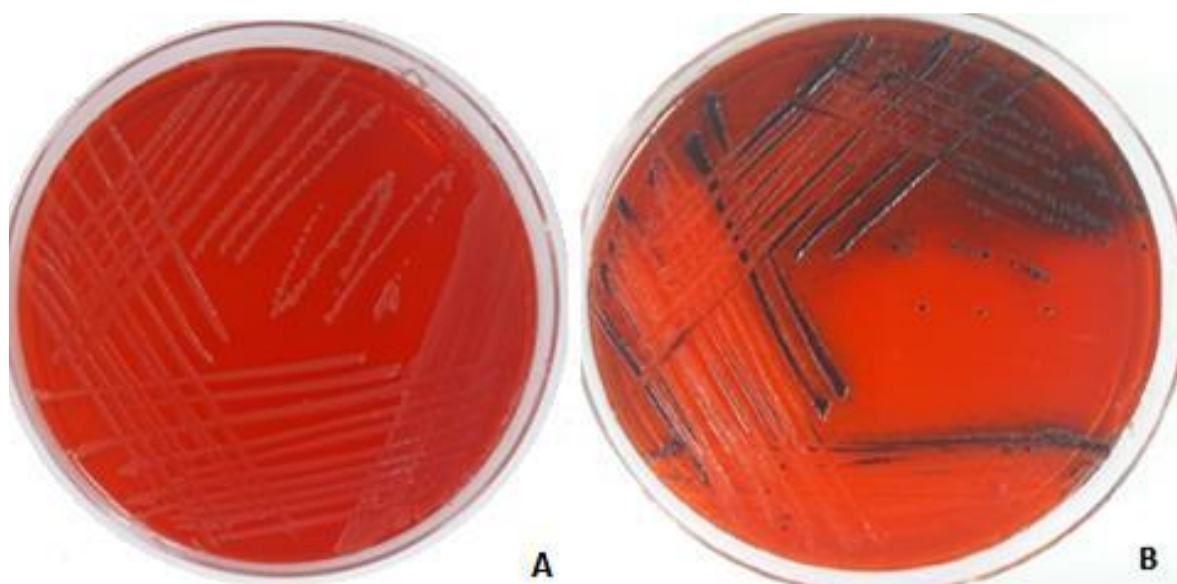


Figura 4 – Teste do Ágar Vermelho Congo. A: colônias com coloração rosada, indicando cepa não formadora de biofilme. B: colônias negras, indicando cepa formadora de biofilme.

5.3 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno

Os isolados foram avaliados quanto a formação de biofilme em microplacas de poliestireno, através do método de coloração com cristal violeta (Figura 5). A DO_{540nm} obtida para os isolados KPC avaliados neste ensaio, variou de $1,091 \pm 0,200$ a $1,495 \pm 0,147$ (Tabela 3). Já a cepa padrão ATCC® 700603 apresentou uma DO_{540nm} de $0,188 \pm 0,012$. Todos os isolados KPC produziram mais biofilme que a cepa padrão ATCC® 700603 ($p < 0.0001$) (Figura 6). O método proposto por Stepanovic et al. (2007) foi utilizado para classificar os isolados e cepa padrão como não formadores, fracos, moderados ou fortes formadores de biofilme. Para essa classificação foi usada

a medida da DO_{540nm} do controle negativo (DO_c). Neste ensaio, foi obtida uma DO_c de 0,188 e então foi feita a seguinte classificação: não formador, $DO \leq 0,188$; fraco formador, $DO 0,188 \leq DO \leq 0,376$; moderado formador, $DO 0,376 \leq DO \leq 0,752$ e forte formador, $DO \geq 0,752$ (Tabela 3). Baseada nesta classificação, a capacidade de formação de biofilme foi observada em todos os isolados bacterianos de origem hospitalar, sendo todos fortes formadores, a cepa padrão ATCC® 700603 não formou biofilme.

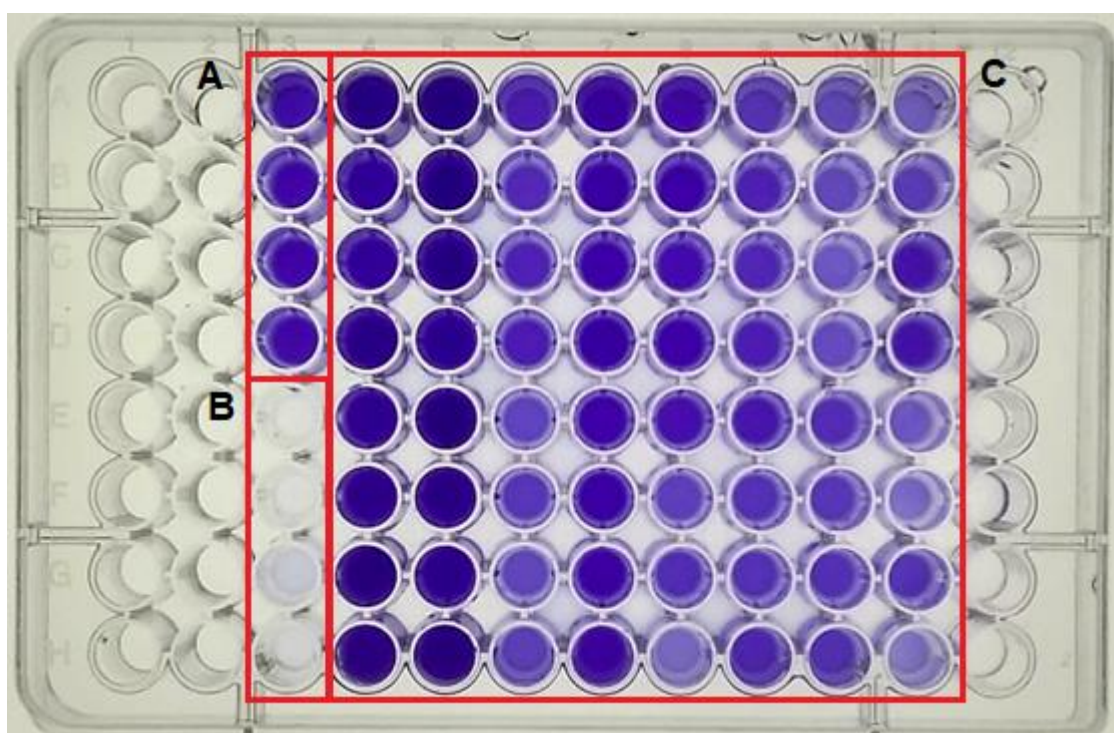


Figura 5 – Placa de microdiluição com formação de biofilme corada com cristal violeta. A: controle positivo para formação de biofilme; B: controle negativo para formação de biofilme; C: área teste com isolados hospitalares inoculados em quadruplicata nas colunas.

Tabela 3 – Relação de resultados para o teste de formação de biofilme em Ágar Vermelho Congo e em microplaca de poliestireno por isolados de *K. pneumoniae*.

Isolado/Teste	AVC	DO (média±desvio padrão)	Classificação (Stepanovic et al., 2007)
ATCC® 700603	+	0,188±0,012	Não formador
KPC4	+	1,245±0,064	Forte formador
KPC6	+	1,495±0,147	Forte formador
KPC9	+	1,111±0,041	Forte formador
KPC11	+	1,091±0,200	Forte formador

AVC: Ágar Vermelho Congo; +: resultado positivo; -: resultado negativo; DO: Densidade Óptica.

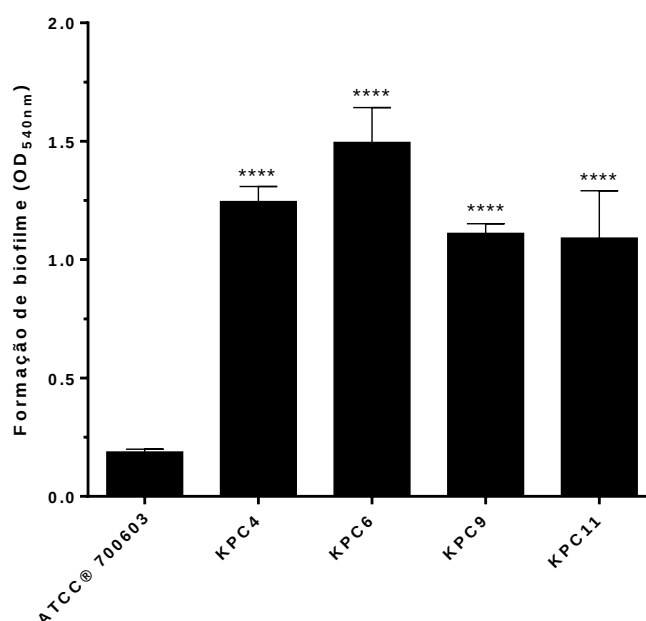


Figura 6 - Quantificação de biofilme para quatro isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase (KPC) e cepa padrão ATCC® 700603. O biofilme formado em placas de poliestireno foi corado com cristal violeta e quantificado por leitura de OD_{540nm}. Resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, analisados por one-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett's. **** $p < 0.0001$ comparada com cepa padrão ATCC® 700603 (não formadora de biofilme).

5.4 Padronização do método de avaliação da formação de biofilme em cateter

Para a padronização do método de avaliação do biofilme em cateter, primeiramente foi analisado o melhor tempo de incubação (24h, 48h e 72h), com base nas contagens realizadas foi gerada uma curva de crescimento, demonstrada na Figura 7. Nela, podemos observar a fase Lag, onde as células incubadas estão se adaptando ao novo meio, passando para fase de crescimento intenso (fase Log). Quando o tempo de incubação chega às 24h, tem-se o pico de crescimento com o maior número de células registrado, e algumas horas depois se inicia a fase estacionária, onde a multiplicação bacteriana diminui, e logo o número de células mortas se equivale ao número células vivas. Após 48h o número de células mortas ultrapassa o número de células vivas. No último tempo avaliado (72h), observa-se uma constante queda no número de células viáveis. Sendo assim, baseando-se na curva de crescimento projetada e as características de crescimento da cepa bacteriana, determinou-se 24h como o melhor tempo de incubação.

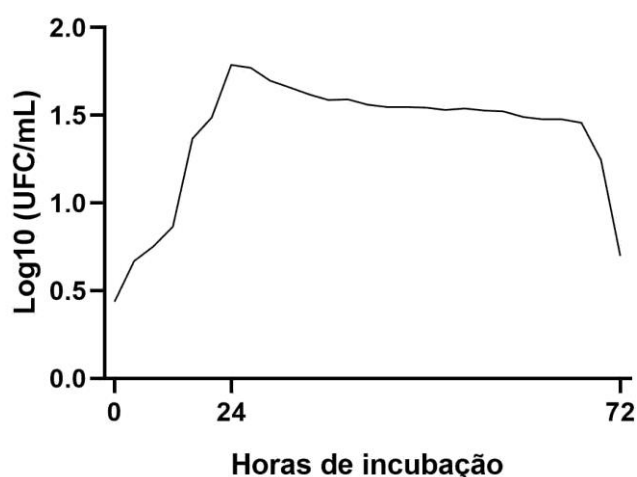


Figura 7 – Curva de crescimento padrão para *K. pneumoniae* ATCC® 700603 em condições laboratoriais, onde a curva traçada foi feita com base na determinação de células viáveis (contagem em meio sólido).

Quando os diferentes métodos de desprendimento de biofilme do cateter foram avaliados, observou-se que as diluições 10^{-1} a 10^{-3} ultrapassaram o limite estabelecido de 300 colônias, apresentando um número ≥ 300.000 UFC/mL, isso para todos os métodos empregados. As diluições 10^{-4} a 10^{-6} apresentaram contagens médias variáveis de acordo com método de desprendimento (Tabela 4). A diluição 10^{-7} não apresentou contagem em placa.

Tabela 4 - Média de contagens de colônias de *K. pneumoniae* ATCC® 700603 nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} após 24h, 48h e 72h de incubação, expressas em UFC/mL.

Tempo de incubação (horas)	Método de desprendimento	Diluição (UFC/mL)			
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
24	Não	0,14	0,00322	0,00021	0
	Vor	1,3	0,03444	0,00041	0
	Son	0,5517	0,01667	0,000211	0
	Vor + Son	0,28	0,00311	0,000044	0
48	Não	0,3083	0,01233	0,000178	0
	Vor	1,2722	0,011	0,000267	0
	Son	0,46	0,0053	0,000089	0
	Vor + Son	0,0209	0,00112	0,000038	0
72	Não	0,0589	0,00005	0	0
	Vor	0,015	0,00047	0,000038	0
	Son	0,0213	0,00063	0,000089	0
	Vor + Son	0,0153	0,00075	0,000012	0

Não: sem método de desprendimento; Vor: utilização de vórtex por 1 min; Son: utilização de sonicação por 1 min; Vor + Son: utilização de vórtex por 1 min seguido de sonicação por 1 min.

Para determinar o melhor método de desprendimento, os resultados obtidos nas contagens da diluição 10^{-4} , foram transformados para $\log_{10}$ e submetidos a teste estatístico one-way ANOVA seguido de Teste de Dunnett's, com $p < 0,05$. Foi possível constatar que a utilização de vórtex por 1 minuto, apresenta diferença significativa quando comparado a não aplicação de força mecânica (Figura 8). Diferente do método de sonicação, o vórtex gera um movimento vibratório orbital, criando um vórtice no líquido, esse movimento é capaz desprender o biofilme sem gerar o rompimento das células.

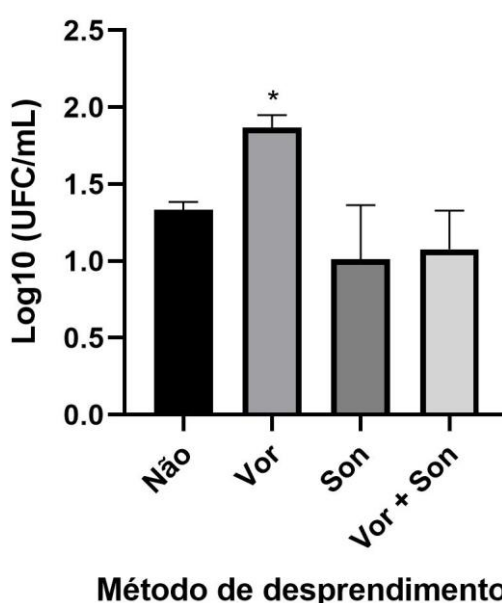


Figura 8 - Representação gráfica para o teste de desprendimento de biofilme utilizando 4 métodos em cepa ATCC® 700603. Os testes foram realizados em triplicata e submetidos a teste one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett's. *Valor de $p < 0,05$ comparado com a não aplicação de força mecânica. Valores representados em UFC/mL.

5.5 Efeito de controle da formação de biofilme das lectinas

Antes de avaliar a atividade controle da formação de biofilme das lectinas oriundas de *Bauhinia forficata* (nBF - nativa; rBF - recombinante), *Bauhinia variegata* (nBVL - nativa; rBVL - recombinante) e *Musa acuminata* (nMA - nativa; rMA - recombinante), foi feita a avaliação da atividade bactericida/bacteriostática, frente a cepa padrão ATCC® 700603. As lectinas não apresentaram efeito bactericida em nenhuma das concentrações testadas, porém apresentaram atividade bacteriostática nas concentrações de 1mg/mL e 2mg/mL.

Dessa forma, analisou-se o efeito das lectinas sobre a formação de biofilme em cateter, utilizando a concentração mínima inibitória (1mg/ml). Estes resultados podem ser observados na Figura 9. A lectina nBVL teve ação inibitória da formação de biofilme em todos os isolados testados ($p < 0,05$). Já a versão recombinante desta lectina (rBVL), apresentou atividade controle da formação de biofilme estatisticamente diferente do controle não-tratado somente para os isolados KPC4 e KPC9. As lectinas nBF, rBF, nMA e rMA foram capazes de inibir a formação de biofilme em todos os isolados (ATCC® 700603, KPC 4, KPC6, KPC 9 e KPC 11), destacando a lectina nBF que demonstrou melhor resposta controle da formação de biofilme. Quando comparada às demais lectinas, a nBF inibiu mais a formação de biofilme na cepa ATCC® 700603 e nos isolados KPC 4, KPC 9 e KPC 11.

Quando comparado o uso das lectinas nas formas nativa e recombinante, para os tratamentos com nBF e rBF não houve diferença estatística, assim como os tratamentos com nMA e rMA. Já os tratamentos com a lectina BVL diferiram, sendo nBVL mais eficiente. Estatisticamente, rBF e rMA não tem diferença entre si, porém, nBF e nMA diferem, além disso, pode-se verificar que nBVL não difere de nBF e nMA.

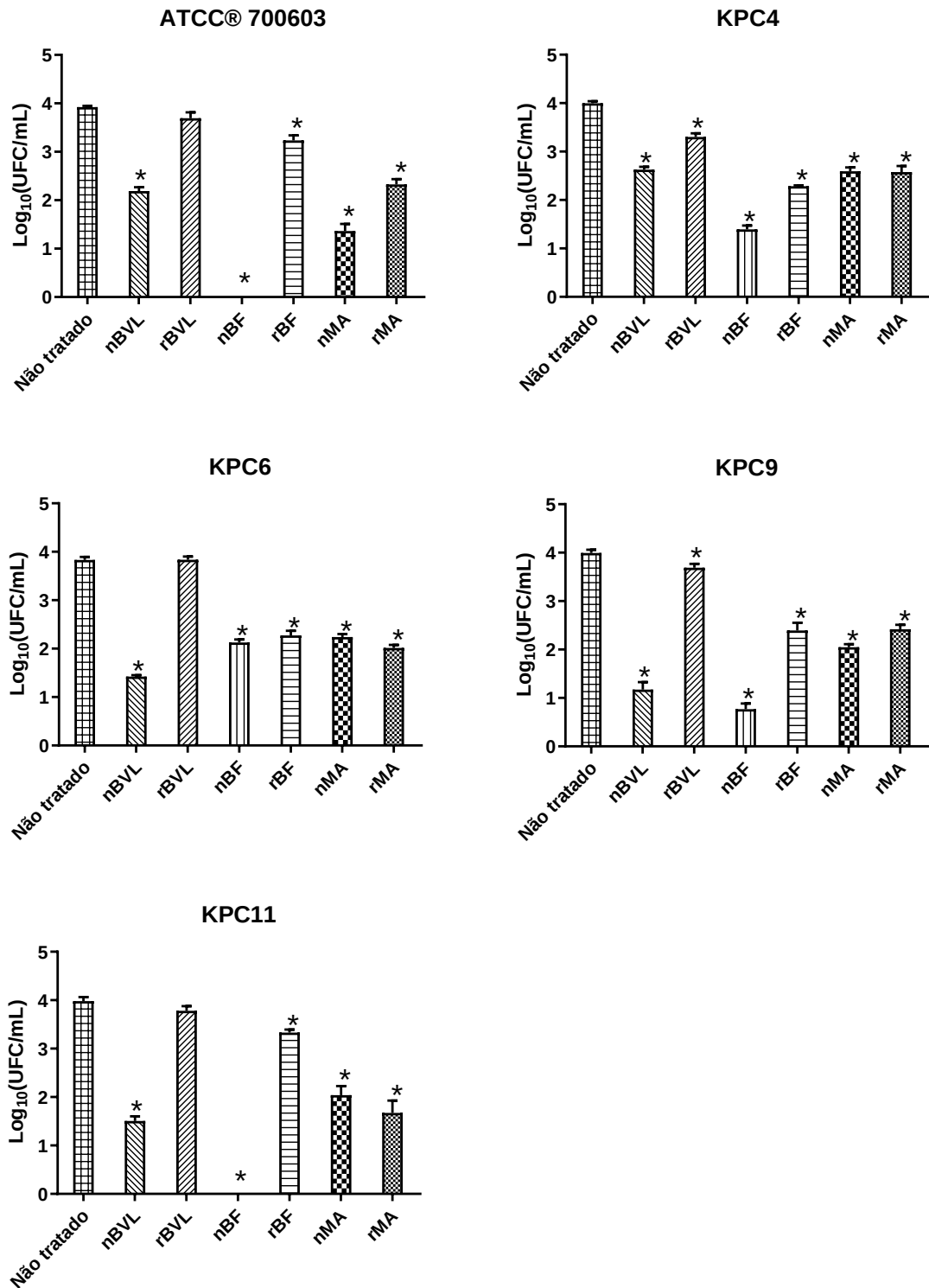


Figura 9 – Representação gráfica da capacidade inibitória de formação de biofilme de lectinas nativas e recombinantes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata*) e banana (*Musa acuminata*) (MIC=1 mg/mL) em isolados *K. pneumoniae* do tipo KPC. Os dados são apresentados como a média $\pm$ DP para cada tratamento. A significância foi determinada por ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições. * $p < 0,05$.

6 Discussão

A bactéria *K. pneumoniae* está classificada na ‘Lista de Prioridade Global de Bactérias Resistentes a Antibióticos para Guiar Pesquisa, Descoberta e Desenvolvimento de Novos Antibióticos’, da Organização Mundial da Saúde (OMS), como nível crítico (WHO, 2017). Esta bactéria apresenta resistência a diferentes antimicrobianos, e a resistência aos carbapenêmicos é a maior preocupação para este grupo. Em nossa pesquisa, utilizamos isolados de origem hospitalar e dentre os 25 confirmados como da espécie *K. pneumoniae*, 48% foram confirmados como isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases (KPC). Ramos-Castañeda *et al.* (2018) realizaram uma análise sistemática e metanálise de mortalidade exclusivamente por *K. pneumoniae* KPC em diversos países (Brasil, Itália, EUA, Grécia, China, outros), com pacientes de diferentes perfis pessoais (sexo, idade, etnia, entre outros) e clínicos (hospitalizados, transplantados, oncológicos, entre outros), e como resultado, obtiveram um índice geral de mortalidade de 41%. Quando a análise se subdivide por países, o Brasil está em primeiro lugar no índice de mortalidade, com 51% dos pacientes. Em outra pesquisa realizada em um hospital na cidade de Santa Maria, RS, Brasil, foram obtidos 70 isolados de pacientes colonizados com a família *Enterobacteriaceae*, desses, 95,7% foram confirmados como *K. pneumoniae*, sendo 98% confirmados como resistentes aos carbapenêmicos (LORENZONI *et al.*, 2017).

Além da resistência aos carbapenêmicos, as cepas de *K. pneumoniae* podem apresentar genes de virulência associados com estruturas de fixação (adesinas e fímbrias/pili) e de proteção (cápsula polissacarídica). Tais genes permitem que a bactéria tenha meios de persistir no corpo do hospedeiro, em dispositivos médicos ou superfícies abióticas, possibilitando a formação de biofilme. A fixação em uma superfície biótica ou abiótica é o primeiro passo para dar início a formação de biofilme, genes como *fimA*, *fimH* e *mrkD* quando presentes no genoma podem expressar estruturas chamadas pili (tipo 1 e 3), que fazem o ancoramento da bactéria e são muito

importantes na patogênese (ALCÁNTAR-CURIEL *et al.*, 2013). A presença e expressão do gene *ecpA* origina as adesinas, que também tem função de fixação. Ainda, a expressão dos genes *rmpA* e *wabG* dão origem a cápsula polissacarídica, estrutura que também auxilia na fixação da bactéria, além de proteger contra fagocitose, protege as células da desidratação e ainda fixa células do entorno, aumento a aglomeração bacteriana e diversificando as espécies presentes no biofilme (CHEN, Z. *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstram a presença desses genes em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Pesquisadores da Universidade Federal de Uberlândia analisaram 33 isolados desta espécie bacteriana, resistentes aos carbapenêmicos e obtidos de pacientes internados em diferentes estados brasileiros (ARAÚJO *et al.*, 2018). Nesse estudo, foi detectada a presença dos genes *fimA*, *mrkD*, *ecpA* e *wabG* em 100% dos isolados. Em outra pesquisa, também feita no Brasil, 50 isolados clínicos foram obtidos de 4 hospitais e avaliados quanto a presença dos genes *fimH*, *wabG* e *mrkD*, sendo amplificados de 100% das amostras (ANDRADE *et al.*, 2018). Em nosso estudo, os isolados avaliados apresentaram pelo menos um dos genes buscados, onde 60% amplificaram o gene *fimA* e *fimH*, 40% o gene *ecpA*, 60% o gene *wabG*, e em nenhum isolado foi identificada a presença dos genes *rmpA* e *mrkD*.

Em âmbito internacional a preocupação com cepas clone e a comunicação entre células, facilitando o compartilhamento de genes de virulência, também é alta. Na Índia foi feita uma pesquisa com cepas coletadas no período de um ano (entre 2014 e 2015), um total de 370 isolados de *K. pneumoniae* foram incluídos no estudo e, dentre eles, 89,1% carregavam o gene *fimH* e 5,1% o gene *rmpA* (REMYA; SHANTHI; SEKAR, 2019). Ainda neste estudo, em 329 isolados, dois ou mais genes coexistiam, corroborando com nosso estudo, onde 80% dos isolados têm dois ou mais dos genes avaliados coexistindo.

Em ambientes naturais, de 95 a 99% dos micro-organismos formam biofilmes, podendo ser encontrados em quase todas as superfícies que possuam nível de umidade suficiente para seu desenvolvimento (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Em ambientes hospitalares, estima-se que cerca de 65% de todas as infecções bacterianas estão associadas a biofilmes bacterianos, incluindo infecções associadas e não associadas a dispositivos médicos (JAMAL *et al.*, 2018). A predominância de micro-organismos formadores de biofilmes associados as IRAS vem sendo

pesquisada em todo o mundo (CHOWDHURY *et al.*, 2018; DE CAMPOS *et al.*, 2016; NIRWATI *et al.*, 2019; RICHARDS *et al.*, 2014; SHARMA, D.; MISBA; KHAN, 2019). No presente estudo, utilizamos dois métodos para avaliação da formação de biofilme nos isolados de *K. pneumoniae* KPC, o Teste do Ágar Vermelho Congo, que é uma forma de detecção fenotípica e que demonstrou que todos os isolados são formadores de biofilme. E o método de avaliação da formação de biofilme em microplaca de poliestireno, que nos fornece uma quantificação do biofilme, onde houve a confirmação de que os isolados são fortes formadores.

Um estudo realizado na Indonésia com isolados de *K. pneumoniae*, demonstrou que de 167 isolados testados, 143 (85,63%) apresentaram capacidade de formar biofilme, entre estes, 45 (26,95%) foram classificados como fortes formadores, 48 (28,74%) moderados formadores e 50 (29,94%) fracos formadores (NIRWATI *et al.*, 2019). Na China, foram coletados 429 isolados de *K. pneumoniae* de pacientes internados, e todos foram capazes de formar biofilme (FU *et al.*, 2018).

A capacidade de crescer e se desenvolver em diversos tipos de superfícies e ambientes, garante a presença constante de biofilmes em diversos setores hospitalares, e de fato, tal característica é confirmada por pesquisas que apresentam sua presença, Seng *et al* (2017) avaliaram 251 amostras de ambientes hospitalares de diversas origens como, leitos de pacientes, estações de enfermagem, estetoscópios, lavatórios, sala de emergência, ambulatórios, entre outros, e após avaliações, 232 foram confirmados como produtores de biofilme. Os biofilmes presentes em ambientes podem persistir em fômites ou ser transferidos de diversas formas, fômite-paciente, fômite-trabalhador, paciente-paciente e paciente-trabalhador (CHOWDHURY *et al.*, 2018).

Os cateteres são dispositivos médicos muito utilizados em pacientes internados em hospitais. Estes dispositivos, de forma geral, são permanentes durante o tempo de internação, mas por diversas vezes manipulados por profissionais da saúde (médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, entre outros), tornando-se uma porta de entrada para patógenos, e sua superfície abiótica e microambiente instalado são propícios para formação de biofilmes, podendo levar à sérias complicações, como a sepse (RIBEIRO *et al.*, 2019). Sendo assim, percebeu-se a necessidade de buscar por um método onde fosse possível detectar a formação de biofilme nestes dispositivos e assim, também o estudo de um composto controle da formação de

biofilme. Para realizar esse tipo de experimento foi necessário padronizá-lo para o grupo bacteriano estudado nessa pesquisa. Foi possível verificar que a contagem é variável de acordo com o método aplicado e difere do padrão dos outros métodos.

Quando aplicamos o método de sonicação, observamos os valores médios se assemelham a não utilização de um método de desprendimento, com contagens baixas. Trampuz et al. (2003) definem a sonicação como um método físico que envolve a aplicação de ultrassom no meio líquido estéril e na peça imersa, seu modo de ação é pela emissão de ondas sonoras que criam áreas com gradiente de pressão em torno da peça, formando microbolhas que se rompem durante a variação da pressão local. A ruptura dessas bolhas libera energia suficiente para soltar o biofilme da superfície, e disponibilizar as células bacterianas no meio líquido, porém essa formação de bolhas também pode ocorrer no meio intracelular e, ou extracelular (cavitação), essas entram em colapso e geram energia química e mecânica causando o efeito bactericida (ZAFRA-ROJAS et al, 2013; CIUFFREDA et al., 2015).

No presente estudo admite-se que o processo de cavitação gerado pela sonicação alterou a contagem de colônias pois, além de soltar o biofilme da superfície do cateter causou danos as células gerando efeito de rompimento celular. Estudos demonstram o uso da sonicação como método bactericida em diversos setores como no processamento de carnes (ALARCON-ROJO *et al.*, 2015; TURANTAŞ; KILIÇ; KILIÇ, 2015) e esterilização de produtos processados (GABRIEL, 2014). Ainda, é possível destacar que a aplicação de sonicação em tempo prolongado ou associado a temperatura (termossonicação) ou pressão (manossonicação) também implica em alterações na estrutura celular (PANIWNYK, 2017).

O biofilme é um ambiente muito propício para a transferência de material genético entre micro-organismos e a comunicação celular. A eliminação dos micro-organismos que compõem o biofilme é um processo difícil, visto que funciona como uma estrutura de resistência ao sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antibióticos. Esses fatores dificultam a erradicação do biofilme maduro, sendo muitas vezes necessária a retirada do dispositivo médico no qual se instalou o biofilme (RIBEIRO *et al.*, 2019). A fim de diminuir o sofrimento do paciente, agravamento do quadro clínico e aumento de custos de tratamento, busca-se componentes naturais ou sintéticos que tenham ação antibiótica e controle da formação de biofilme. A pesquisa de lectinas com tal atividade é estimulada pela intensa busca por moléculas

naturais que tenham capacidade de manter atividade de maneira não-tóxica e biocompatível, capazes de interagir com as bactérias dentro desse microssistema que é o biofilme (GLINEL *et al.*, 2012).

Utilizando lectinas de três plantas diferentes pudemos observar uma diferença de comportamento de ação frente aos isolados testados, essa variação de comportamento pode estar atrelado ao fato de que elas podem interagir com a superfície da bactéria de diversas maneiras. É possível que essas lectinas tenham estabelecido uma interação com os carboidratos presentes na superfície bacteriana, como já demonstrado, lectinas tem capacidade de reconhecer e ligar-se a estas estruturas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Desta forma o efeito das lectinas pode ser aglutinante, reduzindo o número de células capazes de se aderir e formar biofilme (BREITENBACH BARROSO COELHO *et al.*, 2018). Ao incubar simultaneamente a lectina e a bactéria, é possível que ocorra a formação de agregados bacterianos que não se aderem ao lúmen do cateter e permaneceram no poço da placa de poliestireno (LI; LEE, 2017). Outro efeito de aglutinação bacteriana também ocorre principalmente interferindo nos componentes da matriz polimérica extracelular, podendo afetar a polimerização do biofilme e prejudicando sua estruturação (HASAN; OZEKI; KABIR, 2014).

As infecções causadas por biofilmes são mais complicadas no ambiente hospitalar e, até o momento, não há um composto antimicrobiano específico para tratar esse tipo de infecção (DE OLIVEIRA JÚNIOR; FRANCO, 2020), bem como, eliminar os biofilmes formados no ambiente hospitalar. Com a busca por compostos controle da formação de biofilme, as pesquisas com lectinas, de diversas origens, vêm aumentando devido às suas características e possibilidades de abordagem, inibição do crescimento, adesão, aglutinação (BREITENBACH BARROSO COELHO *et al.*, 2018). Em um estudo usando lectinas provenientes de algas e plantas, os pesquisadores propuseram que tanto em estado planctônico quanto em biofilme, cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomona aeruginosa* foram sensíveis a ação das lectinas, diminuindo a biomassa ou inibindo completamente a formação de biofilme (VASCONCELOS *et al.*, 2014). Em outra pesquisa, utilizando lectinas isoladas de batata (cultivares de Bangladesh 'Desh'), foi constatada ação bactericida e inibidora da formação de biofilmes em

bactérias gram-positivas e gram-negativas, com redução de 5% a 20% da biomassa de biofilme, dependendo da concentração utilizada (HASAN; OZEKI; KABIR, 2014).

A prevenção da formação de biofilme na sua fase inicial de adesão, ou interferir na polimerização na fase de biofilme maduro, são estágios em que as lectinas podem ser aplicadas. Ainda, compostos naturais com ação antibacteriana, como as lectinas, são uma excelente opção para potencializar a atividade de antibióticos convencionais. Quando o sinergismo ocorre, permite o uso de concentrações menores do medicamento, reduzindo efeitos adversos nos pacientes, e a seleção de cepas resistentes. Porém, são necessárias mais pesquisas para elucidação do mecanismo de ação das lectinas utilizadas no presente estudo, frente à célula bacteriana e frente ao biofilme em formação e maduro. Acredita-se que os dados apresentados neste trabalho, servirão de suporte para pesquisas futuras na busca de uma terapia antibiótica e controle da formação de biofilme contra *K. pneumoniae* KPC.

7 Conclusão

- Dentre as 34 amostras analisadas, 75,53% foram confirmadas como *K. pneumoniae* através da amplificação do gene *dnaA*;
- Após aplicação da técnica de PCR, é possível concluir que dentre isolados confirmados como *K. pneumoniae*, 48% foram confirmados como portadores do gene *bla_{KPC}*;
- Dos isolados utilizados nesta pesquisa, 60% apresentaram os genes *fimA* e *fimH*, 40% o gene *ecpA*, 60% o gene *wabG* e nenhum apresentou os genes *rmpA* e *mrkD*;
- De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, é possível concluir que a utilização do vórtex é eficiente para avaliação da formação de biofilme em cateter por *K. pneumoniae*;
- As lectinas nBVL, nBF, rBF, nMA e rMA na concentração de 1mg/ml, apresentaram atividade controle da formação de biofilme frente a cepa padrão e todos os isolados de *K. pneumoniae* avaliados;
- Ainda, conclui-se que lectina nBF demonstrou maior capacidade controle da formação de biofilme em comparação as outras lectinas testadas.

Referências

- ALARCON-ROJO, A. D. *et al.* Power ultrasound in meat processing. **Meat Science**, [s. l.], v. 107, p. 86–93, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.015>
- ALCÁNTAR-CURIEL, María D. *et al.* Multi-functional analysis of *Klebsiella Pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 129–138, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.22974>
- ANDRADE, Leonardo Neves *et al.* Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 164–168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007>
- ARAÚJO, Bruna Fuga *et al.* Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 523–528, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000711>
- BEIRÃO, Elisa Maria *et al.* Clinical and microbiological characterization of KPCproducing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 69–73, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70143-X](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70143-X)
- BENGOCHEA, José A.; SA PESSOA, Joana. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 125, n. 5, p. 1238–1252, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14055>
- BÜKER, Eda; ADNAN, Ibrahim. Antiviral Potential of Medicinal Plants and Plant Lectins : Use in COVID-19 Pandemic Era. **Journal of Pharmaceutical Research International**, [s. l.], v. 33, p. 289–299, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/JPRI/2021/v33i28A31535>

CANDAN, Esra Deniz; AKSÖZ, Nilüfer. Klebsiella pneumoniae: Characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 867–874, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148

CANTÓN, Rafael; MOROSINI, María Isabel. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 977–991, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x>

CECHINEL-ZANCHETT, Camile Cecconi *et al.* Bauhinia forficata link, a Brazilian medicinal plant traditionally used to treat cardiovascular disorders, exerts endothelium-dependent and independent vasorelaxation in thoracic aorta of normotensive and hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 243, n. July, p. 112118, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112118>

CHEN, Chang Shan *et al.* Functional characterization of chitin-binding lectin from Solanum integrifolium containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC Plant Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1222-0>

CHEN, Zhenhong *et al.* A novel PCR-based genotyping scheme for clinical Klebsiella pneumoniae. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 21–32, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.137>

CHOWDHURY, D. *et al.* Transfer of dry surface biofilm in the healthcare environment: the role of healthcare workers' hands as vehicles. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. e85–e90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.021>

COSTERTON, J.W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. **International Journal of Artificial Organs**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1062–1068, 2005. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2006029510>

DA SILVA PINTO, Luciano *et al.* Heterologous expression and characterization of a new galactose-binding lectin from Bauhinia forficata with antiproliferative activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 877–884,

2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.090>

DE CAMARGO, Laura Junqueira *et al.* Antiviral activity of native banana lectin against bovine viral diarrhea virus and bovine alphaherpesvirus type 1. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 157, p. 569–576, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.125>

DE CAMPOS, Paola Amaral *et al.* Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 617–627, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-016-0996-x>

DE MELO, Arthur Alves *et al.* HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 64, p. 435–442, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.035>

DE OLIVEIRA JÚNIOR, Nelson G.; FRANCO, Octávio L. Promising strategies for future treatment of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 63–79, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0180>

DOS SANTOS SILVA, Priscila Marcelino *et al.* Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 140, p. 234–244, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.059>

ESTRADA-MARTÍNEZ, Laura Elena *et al.* Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18071403>

FANG, Chi Tai *et al.* *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: An emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 284–293, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/519262>

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**, [s. l.], v. 124, n. July, p. 152–162, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.027>

FU, Li *et al.* Frequency of virulence factors in high biofilm formation blaKPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 116, n. October 2017, p. 168–172, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.030>

GABRIEL, Alonzo A. Inactivation behaviors of foodborne microorganisms in multi-frequency power ultrasound-treated orange juice. **Food Control**, [s. l.], v. 46, p. 189–196, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.012>

GHAZARIAN, Haïke; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>

GLINEL, K. *et al.* Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1670–1684, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011>

HAMID, Rabia *et al.* Lectins: Proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s. l.], v. 3, n. 4SUPPL.1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.34.S18>

HAMILTON, Kelly L. *et al.* Effects of *Maackia amurensis* seed lectin (MASL) on oral squamous cell carcinoma (OSCC) gene expression and transcriptional signaling pathways. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 147, n. 2, p. 445–457, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03456-8>

HANEY, Evan F *et al.* Supplemental Materials for “ Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides ”
Evan F. Haney † , Michael J. Trimble † , John T. Cheng, Quentin Vallé and Robert E.W. Hancock †. **Biomolecules**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004827.Lewenza>

HASAN, Imtiaj; OZEKI, Yasuhiro; KABIR, Syed Rashel. Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*). **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 142–148, 2014.

HENDRICKSON, O. D.; ZHERDEV, A. V. Analytical Application of Lectins. **Critical**

Reviews in Analytical Chemistry, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 279–292, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1422965>

HOLT, Kathryn E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 27, p. E3574–E3581, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 9–18, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(95\)91449-U](https://doi.org/10.1016/0956-7135(95)91449-U)

HORCAJADA, Juan P. *et al.* Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 1–52, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 8, n. 12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/psb.26595>

JAMAL, Muhsin *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

JIMÉNEZ, Pilar *et al.* Lectin digestibility and stability of elderberry antioxidants to heat treatment in vitro. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22010095>

JYOTHIRMAYI, N; RAO, Mallikarjuna. Banana Medicinal Uses. **Jour of Med Sc & Tech**, [s. l.], v. 4(2), n. November, p. 152–160, 2015.

KARAKONSTANTIS, Stamatis; KRITSOTAKIS, Evangelos I.; GIKAS, Achilleas. Pandrug-resistant gram-negative bacteria: A systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 271–282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz401>

KRISTIANE, Alves Araújo; MAXIM, Repetto; IRES, Paula de Andrade Miranda. Use

of the medicinal plant *Bauhinia forficata* Link. by carriers of type 2 diabetes mellitus: A study in the Brazilian amazon. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 144–154, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/jmpr2019.6815>

KUMAR, S.; VARELA, Manuel F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 306, p. 231–250, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_9

LAM, Margaret M.C. *et al.* Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *klebsiella pneumoniae* populations. **Microbial Genomics**, [s. l.], v. 4, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000196>

LEBEAUX, David *et al.* From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 288–356, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>

LI, Xi Hui; LEE, Joon Hee. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 753–766, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7274-x>

LIU, Pin *et al.* Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 190–198, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0061>

LORENZONI, Vinícius Victor *et al.* Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 685–688, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0209-2017>

LOU, Zaixiang *et al.* The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 80, p. 371–377, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037>

LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2021. Disponível em <<http://www.bacterio.net/klebsiella.html>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

MBAE, K. M.; UMESHA, S.; MANUKUMAR, H. M. Therapeutic properties of lectins in

herbal supplements. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 627–643, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9572-2>

MCCARTHY, Ronan R. *et al.* Antimicrobial Inks: The Anti-Infective Applications of Bioprinted Bacterial Polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 1155–1159, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.05.004>

MOHSIN, Sabeeh; AKHTAR, Naveed. Formulation and stability evaluation of Bauhinia variegata extract topical emulsion. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 945–954, 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**, [s. l.], v. 119, n. 3, p. 666–676, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12882>

NIKOLAEV, Yu A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm-"city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 125–138, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>

NIRWATI, Hera *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. **BMC Proceedings**, [s. l.], v. 13, n. Suppl 11, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>

OLIVEIRA, Wesley F. *et al.* Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: Application to red blood cells. **Methods and Applications in Fluorescence**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab9694>

OLIVIERA, Máira Maciel Mattos de; BRUGNERA, Danilo Florisvaldo; PICCOLI, Roberta Hilsdorf. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão Microbial biofilms in the food industry : a review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. Klebsiella pneumoniae : ir a la ofensiva con una defensa fuerte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>.Address

PANIWNYK, L. Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 38, p. 794–806, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.025>

PINTO, Luciano S. *et al.* Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from Bauhinia variegata seeds. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 355–363, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0055-2>

POIROUX, Guillaume *et al.* Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18061232>

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**, [s. l.], v. 98, p. 419–429, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.019>

RABIN, Nira *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>

RAMOS-CASTAÑEDA, Jorge A. *et al.* Mortality due to KPC carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC Klebsiella pneumoniae infections. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 438–448, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.02.007>

REMYA, P. A.; SHANTHI, M.; SEKAR, Uma. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in Klebsiella pneumoniae. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 210–218, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_157

RIBEIRO, Amanda Cristina *et al.* Prevalência de microorganismos em infecções e casos de SEPSE associadas ao cateter: uma revisão da literatura. **Ciência & Inovação**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 55–60, 2019.

RICHARDS, Guy A. *et al.* Investigation of biofilm formation on a charged intravenous catheter relative to that on a similar but uncharged catheter. **Medical Devices**:

Evidence and Research, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 219–224, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/MDER.S63449>

RODRÍGUEZ-ROJAS, Alexandro *et al.* Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 303, n. 6–7, p. 293–297, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>

SAUNDERS, J. R. Genetics and Evolution of Antibiotic Resistance. **British Medical Bulletin**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 54–60, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071948>

SENG, Rathanin *et al.* Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184172>

SHARMA, Divakar; MISBA, Lama; KHAN, Asad U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>

SHARMA, Neha *et al.* Isolation of phytochemicals from Bauhinia variegata L. Bark and their in vitro antioxidant and cytotoxic potential. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox8100492>

SINGH, Amandeep; SINGH, Narinder; PABLA, Dilrose. A Review on Medicinal Uses of Bauhinia Variegata Linn. [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2347–7881, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.29161/PT.v7.i6.2019.12>

STAHLHUT, Steen G. *et al.* Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in klebsiella pneumoniae. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 191, n. 6, p. 1941–1950, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00601-08>

SYDNOR, Emily R.M.; PERL, Trish M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 141–173, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-10>

TARASZKIEWICZ, Aleksandra *et al.* Innovative strategies to overcome biofilm

resistance. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/150653>

TEIXEIRA, Edson Holanda *et al.* Biological applications of plants and algae lectins: an overview. *In: BIOCHEMISTRY, GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY: CARBOHYDRATES - COMPREHENSIVE STUDIES ON GLYCOBIOLOGY AND GLYCOTECHNOLOGY*. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/2702>

TURANTAŞ, Fulya; KILIÇ, Gülden Başıyigit; KILIÇ, Birol. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 198, p. 59–69, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.026>

VAN HOLLE, Sofie *et al.* Comparative study of lectin domains in model species: New insights into evolutionary dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18061136>

VASCONCELOS, Mayron Alves *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/365272>

VUOTTO, Claudia; DONELLI, Gianfranco. Novel Treatment Strategies for Biofilm-Based Infections. **Drugs**, [s. l.], v. 79, n. 15, p. 1635–1655, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01184-z>

WATNICK, Paula. MINIREVIEW Biofilm , City of Microbes. **Society**, [s. l.], v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WU, Bing (Catherine) *et al.* Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents. **npj Biofilms and Microbiomes**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00182-4>

YAO, Hong *et al.* Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 25, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30628-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30628-X)

