

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS  
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL

NINA QUINTANILHA COSTA

Avaliação da atividade antimicrobiana de peptídeos de origem vegetal em  
bactérias de importância para saúde pública.

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Setembro de 2021

NINA QUINTANILHA COSTA

Avaliação da atividade antimicrobiana de peptídeos de origem vegetal em bactérias de importância para saúde pública.

Dissertação apresentado à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração de Sanidade Animal.

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Setembro de 2021

## **NINA QUINTANILHA COSTA**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL EM BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA PARA SAÚDE PÚBLICA.**

Dissertação apresentado à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração de Sanidade Animal.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Professora Valdirene Moreira Gomes (Dra, Biociências e Biologia Molecular) – CBB/UENF

---

Solange Silva Samarão (Dra. Biociências e Biotecnologia) – EXTERNO

---

Professor Leonardo Serafim da Silveira (Dr. em Produção Animal )- CCTA/UENF

---

Professor. Olney Vieira da Motta ( Dr. Biociências e Biotecnologia) – CCTA/UENF  
(ORIENTADOR)

## Agradecimentos

A DEUS, pelo dom da vida e por tornar possível a realização deste trabalho;

Aos meus pais pelo amor, compreensão e apoio nas horas mais difíceis;

Aos meus irmãos Michelle, Germano e Míriam por serem minhas inspirações e meu porto seguro.

Ao meu orientador Prof. Olney Vieira da Motta por ser um grande incentivador e não medir esforços para a obtenção de bons resultados e pela paciência nas horas devidas;

A amiga e colaboradora Milena Beireli por toda ajuda, amizade, ensinamentos, gentilezas e disponibilidade sempre que foi preciso para realização deste trabalho;

Amiga Maria Luiza, companheira de pesquisa e de muitos os outros trabalhos, obrigada por toda calma, presença, ajuda nos experimentos.

A querida, doce e gentil amiga Erica, que surgiu na minha vida para me ajudar no momento mais difícil.

Ao meu amado Ryan pelo carinho, dedicação e calma nos momentos mais estressantes.

Aos amigos Aline Luize e Hassan Jerdy por toda a ajuda, incentivo e amizade.

As queridas técnicas do laboratório Gina e Lourdes por todo ensinamento, paciência e ajuda em todo o meu trajeto nesses anos juntos.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela concessão do apoio acadêmico e financeiro para esta pesquisa.

## RESUMO

O fenômeno da resistência bacteriana está crescendo, tornando-se um problema de saúde pública global. Diante dessa situação, iniciou-se a busca por métodos alternativos de tratamento de doenças bacterianas multirresistentes com a utilização de compostos vegetais contendo peptídeos antimicrobianos. Os objetivos deste estudo foram avaliar a ação antimicrobiana dos extratos de *Phaseolus vulgaris* e *Clitoria fairchildiana* sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. pseudintermedius* e *Escherichia coli*. O ensaio de inibição foi realizado em microplaca, 24 horas a 37 ° C, sendo realizada leitura para verificação dos níveis de absorvância. Para avaliar o sinergismo, os extratos foram adicionados ao ágar após a semeadura da bactéria e, por fim, os antibióticos foram depositados sobre a bactéria em ágar. Na etapa de interação, os inóculos foram tratados com os extratos por 24 horas a 37%, a seguir semeados na placa Mueller Hinton e adicionados os antibióticos analisados. Os resultados de inibição do extrato de *C. fairchildiana* sobre *Staphylococcus* e *E. coli*, com o extrato de *P. vulgaris*, houve inibição com *E. coli*. Foi possível verificar sinergismo entre os extratos e antibióticos para os gram positivos e negativos analisados, bem como a interação dos antimicrobianos para bactérias tratadas com extratos vegetais de *C. fairchildiana* e *P. vulgaris*

**Palavras-chave:** extratos vegetais, bactérias, saúde pública.

## ABSTRACT

The phenomenon of bacterial resistance is growing, becoming a global public health problem. In view of this situation, the search for alternative methods of treating multiresistant bacterial diseases was initiated with the use of plant compounds containing antimicrobial peptides. The objectives of this study were to evaluate the antimicrobial action of *Phaseolus vulgaris* and *Clitoria fairchildiana* extracts on *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. pseudintermedius* and *Escherichia coli*. The inhibition assay was carried out in a microplate, 24 hours at 37°C, reading was performed to verify the absorbance levels. To evaluate the synergism, the extracts were added to the agar after the bacteria were seeded and finally the antibiotics were deposited on the bacteria in agar. In the interaction evaluation stage, the inocula were treated with the extracts for 24 hours at 37°C, then seeded on the Mueller Hinton plate and the analyzed antibiotics were added. The results showed inhibition of *C. fairchildiana* extract on *Staphylococcus* and *E. coli*, with the extract of *P. vulgaris*, there was inhibition with *E. coli*. It was possible to verify synergism between the extracts and antibiotics for the gram positive and negative analyzed, as well as the interaction of antimicrobials for bacteria treated with plant extracts of *C. fairchildiana* and *P. vulgaris*.

**Key words:** plant extracts, bacteria, public health

# SUMÁRIO

1.0 Introdução.....	12
2.0 Revisão de literatura.....	13
2.1 Resistência bacteriana.....	13
2.2 Bactérias de importância para a saúde pública.....	16
2.3 Plantas da Família Fabaceae.....	21
2.3.1 Gênero Clitoria.....	21
2.4 Planta do gênero Phaseolus.....	24
2.5 Peptídeos antimicrobianos de origem vegetal .....	26
3.0 Objetivos.....	30
3.1. Objetivos Gerais.....	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
4.0 Justificativa.....	31
5.0 Material e Métodos.....	33
5.1 Linhagem dos Microorganismos testado.....	33
5.2 Amostras testadas.....	33
5.3 Cultivo das Bactérias.....	33
5.4 Ensaios de inibição de crescimento bacteriano com extratos vegetais de <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Clitoria fairchildiana</i> , por microdiluição.....	33
5.5 Leitura Espectrofotométrica.....	35
5.6 Análise da viabilidade celular pela técnica de Spread-plate.....	35
5.6.1 Seleção dos micropoços.....	35
5.6.2 Etapa do plaqueamento .....	36
5.7 Avaliação da interação de extratos vegetais de <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Clitoria fairchildiana</i> , antibióticos e bactérias em ágar muller hilton....	37
5.8 Avaliação de interação dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais de <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	39
5.9 Atividade Hemolítica.....	41
6.0 Resultados.....	42
6.1 Teste de inibição do crescimento bacteriano em microplaca.....	42
6.2 Resultados do teste de viabilidade celular.....	47
6.3 Avaliação da interação de extratos, antibióticos e bactérias em	

ágar Muller Hilton.....	47
6.4 Resultados da avaliação de interação dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais.....	49
6.5 Resultado da Atividade Hemolítica.....	52
7.0 Discussão.....	53
8.0 Conclusão.....	58
9.0 Referências Bibliográficas.....	59

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de variância
FDA.....	Food and Drug Administration
ESBL.....	Beta-lactamase de espectro estendido
CLSI.....	Clinical and Laboratory Standards Institute
MRSA	Methicillin Resistant Staphylococcus aureus” – Staphylococcus aureus resistentes à metilina
ATCC.....	American Type Culture Collection
[ ].....	Concentração
Ptn.....	Proteína
h.....	Horas
µl.....	Microlitro
µg.....	Micrograma
ml.....	Mililitro
°C.....	Grau celsius
NaCl.....	Cloreto de sódio
BHA.....	Ágar sangue base
UFC.....	Unidade Formadora de Colônias

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Letra A Sombreiro adulto, Letra B folha da <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	22
Figura 2: Representação do fruto madura, letra C; sementes letra D de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	22
Figura 3: Folhada <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	23
Figura 4: Características morfológicas do <i>Phaseolus vulgaris</i> ; Letra A: folhas e planta adulta; B: sementes e forma do legume; C: forma e cor dos frutos; D: Cor da flor.....	25
Figura 5: Representação da distribuição dos componentes do ensaio na microplaca de 96 poços.....	35
Figura 6: Representa esquemática das etapas da técnica de plaqueamento.....	37
Figura 7: Representação esquemática das etapas do teste de avaliação de sinergismo dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais.....	39
Figura 8: Representação esquemática das etapas do teste de avaliação da interação dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais.....	40
Figura 9: Teste de hemólise em poço no ágar sangue, de extrato de <i>Clitoria fairchildiana</i> (esquerda) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (direita) em quatro concentrações diferentes.....	52

## LISTA DE GRÁFICO

	Páginas
Gráfico 1: Valores de absorvância em diferentes concentrações de extrato de <i>Phaseolus vulgaris</i> sobre o <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	42
Gráfico 2: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Clitoria fairchildiana</i> sobre o <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	43
Gráfico 3: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Phaseolus vulgaris</i> sobre o <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	43
Gráfico 4: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Clitoria farchildiana</i> sobre o <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	44
Gráfico 5: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Phaseolus vulgaris</i> sobre o <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
Gráfico 6: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Clitoria farchildiana</i> sobre o <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
Gráfico 7: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Phaseolus vulgaris</i> sobre a <i>Escherichia coli</i> .....	46
Gráfico 8: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de <i>Clitoria farchildiana</i> sobre o <i>Escherichia coli</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1: Diferentes concentrações dos extratos vegetais testados.....	34
Tabela 2: Resultado da viabilidade celular, pelas médias dos valores de contagem das colônias, comparadas as médias do controle positivo.....	47
Tabela 3: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias dos extratos de <i>Clitória fairchildiana</i> (C.F) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (P.V), com a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
Tabela 4: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias dos extratos de <i>Clitória fairchildiana</i> (C.F) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (P.V), com a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	49
Tabela 5: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de <i>Clitória fairchildiana</i> com a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
Tabela 6: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de <i>Phaseolus vulgaris</i> com a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
Tabela 7: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de <i>Clitória fairchildiana</i> , com a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	51
Tabela 8: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de <i>Phaseolus vulgaris</i> , com a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	52

## 1.0 Introdução

A descoberta dos agentes antimicrobianos trouxe para a medicina, avanços importantes em saúde pública com a diminuição do número de mortes por infecções bacterianas. No entanto, há poucas décadas, uma situação distinta a essa, como o primeiro caso de resistência à penicilina foi testemunhada e por anos depois registrou-se novas bactérias patogênicas que não respondiam aos antibióticos usados (CHANG et al. 2013).

Mesmo possuindo todo o conhecimento sobre as causas desse fenômeno de resistência bacteriana como: os erros de procedimentos preventivos de infecções hospitalares, relativos aos cuidados de higiene hospitalar e prescrições excessivas de antibióticos, associadas à capacidade individual delas realizarem mutações genéticas, foi crescente o avanço desse processo (CARVALHO e GONTIJO 2008). E esse impacto gerado, foi sentido com o aumento das morbidades, mortalidades e maior duração nas internações, que acarretaram em elevados custos dos tratamentos hospitalares, culminando em um processo desafiador de saúde pública internacional, (PAIM e LORENZINI 2014) reconhecido pela Organização Mundial (OMS, 2012).

Diante do quadro instalado de contínuo aparecimento de patógenos ameaçando a vida de humanos e animais, conduziu-se para uma necessidade urgente de novos compostos, já que os antibióticos antigos se tornaram não tão eficazes para alguns clones das atuais bactérias (CHANG et al. 2013). Assim uma acelerada busca por métodos alternativos, para o tratamento e prevenções de doenças causadas multirresistentes iniciou-se (BADKE et al., 2011; FEITOSA et al., 2011).

Nessa caminhada descobriu-se que o reino vegetal é uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos e que são usados tradicionalmente por diferentes populações de todo o mundo, para o controle de doenças e pragas (VEIGA Jr. et al., 2005; BALUNAS e KINGHORN, 2005). Por tamanha biodiversidade, muitas ainda não tiveram qualquer avaliação científica do seu potencial e uso medicinal, o que estimula estudos para utiliza-las com segurança pela população (STEFANELLO et al., 2006).

Com o mesmo intuito esse trabalho selecionou extratos vegetais contendo peptídeos antimicrobianos para avaliação de suas ações antibacterianas contra bactérias de importância para a saúde pública.

## 2.0 Revisão de Literatura

### 2.1 Resistência bacteriana

A chamada “ERA” dos antibióticos se iniciou no século 20 e caracterizou-se pela busca em desenvolver compostos direcionados a eliminar microrganismos bacterianos. Em 1910 Paul Ehrlich inovou o tratamento da sífilis com a arsfenamina. Mas foi após 18 anos desse fato inédito, que em 1928 Alexander Fleming em seu laboratório, descobriu a ação do fungo *Penicillium notatum*, sobre as bactérias *Staphilococcus aureus*, dando o primeiro passo para o movimento de descobertas de um antibiótico que salvaria milhões de pessoas em todo o mundo.

A penicilina foi introduzida aos tratamentos clínicos para controle de doenças infecciosas em 1941 por Florey e Chain que continuaram com as pesquisas mesmo ela ainda não sendo uma droga totalmente purificada (SILVEIRA et al., 2006; SENGUPTA et al. 2013; TANG et al. 2014). Depois de muitos anos, através de técnicas de sequenciamento, outros antibióticos foram criados ao mesmo tempo desse processo revolucionário para a saúde da população mundial, surgiam às primeiras cepas bacterianas resistentes à penicilina (FAIR e TOR 2014).

O fato de microrganismos não serem eliminados na presença de antibacterianos, se tornou um problema ainda maior com o passar do tempo, principalmente pelo uso indiscriminado dos antibióticos (WANG, 2015). A resistência bacteriana significa exatamente isso, a capacidade de um agente, resistir à ação de um ou mais compostos terapêuticos (ANVISA, 2017). E atualmente é apontada como uma grave ameaça à saúde humana a nível global (VIEIRA, 2017), pois causa aumento no número de mortes assim como de hospitalizações e torna os tratamentos mais longos e altamente custosos (FAIR e TOR 2014).

Esse mecanismo de autoproteção pode ser adquirido pelas bactérias das seguintes maneiras: pela resistência intrínseca e adquirida, essa aparece através de mutações, transferência de genes por conjugação ou transformação, pelos transposons, integrons e até bacteriófagos (RICE et al. 2003; RAGHUNATH, 2008). A intrínseca é a principal e mais complexa forma de resistência, por que é dependente de uma série de relações como a impermeabilidade da célula bacteriana à molécula de antibiótico, de

características físicas e químicas e da presença de bombas de efluxo assim como as enzimas que inativam compostos dos antibióticos. Então, ela necessita de fatores genéticos, fenotípicos e funções metabólicas para que o processo possa acontecer (FERNANDEZ 2012; OLIVARES et al. 2013; PALMA et al. 2020).

Essas características dos organismos em adquirirem resistências estão se perpetuando por eventos como a manutenção do uso de antimicrobianos de forma indevida, nos setores da medicina humana e principalmente na veterinária e a nível ambiental. Acentuada pela capacidade de disseminação desses mecanismos, pelos próprios microrganismos dentro desses eventos. (HOLMES et al. 2016). Sabe-se que na rotina médica em humanos a prescrição excessiva, desnecessária em doses e tempos indevidos é comum, somado aos diferentes e desnecessários protocolos terapêuticos nas unidades de terapia intensiva, que envolvem entre 30 a 60% dos casos de uso com antibióticos inapropriados (ESSACK e SARTORIUS, 2018).

Na medicina veterinária o uso de antimicrobianos acontece desde, 1948, mas foi em 1951 que o Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou como aditivo em baixas doses nas alimentações dos animais de rebanhos como de bovinos, peixes, aves e suínos. Chamados de promotores de crescimento os antibióticos conseguem manter a qualidade da microbiota intestinal boa, evitando a competição entre microrganismo da flora por nutrientes necessários e dessa forma reduzir a produção de compostos que afetam o crescimento do animal (GONZALES et al. 2012).

A utilização desses antibióticos na veterinária, agricultura e indústria de alimentos de origem animal, superaram os da medicina humana (WALSH, 2018), que ao longo prazo, os mesmos antibióticos foram compartilhados nessas áreas consequentemente exerceram, uma pressão seletiva nas bactérias e reduziram a eficácia aos tratamentos da maioria dos antibióticos (AARESTRUP et al. 2008). O que a tornou uma das fontes significativas de compostos residuais no meio ambiente (TYLOVA et al., 2010).

A aquicultura é um setor responsável por grande parte da produção de peixes que é consumida no mundo. E do mesmo modo que as criações

de produção intensiva e semi-intensivas terrestres causam estresse e maior incidência de doenças infecciosas aos animais, esse sistema aquático também sofre com perdas econômicas (ECDC, 2017). A fim de evitar esse problema, antibióticos são utilizados nas práticas de manejo e alimentação, como promotores de crescimentos e fins terapêuticos. No momento ainda não houve uma separação desses antibacterianos para uso exclusivo na aquicultura e esses estão simultaneamente destinados aos outros setores da medicina e veterinária elevando o início e difusão de microrganismos resistentes (SANTOS e RAMOS, 2018). E dessa forma, conseqüentemente, traços de resistências em elementos como alimentos e o ambiente (RYU et al. 2012 ; CABELLO et al. 2013).

A Organização Mundial da Saúde selecionou as classes de antibióticos com maior importância na diminuição da eficácia desses compostos no tratamento de doenças em humanos, dentre elas estão as sulfonamidas, penicilinas, quinolonas e tetraciclinas (CABELO et al. 2013; AICH et al. 2018).

Como fator incentivador desse processo, os animais de companhia também são responsáveis, apesar de toda a melhoria com a saúde, higiene e bem estar animal (ROWAN e KARTAL 2018). O aumento do contato entre eles e os humanos, incentivou o aparecimento de resistência bacteriana, principalmente pelos *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (PENNA et al. 2021) *S. schleiferi* encontrados em dermatopatias e otopatias, assim como os *S. pseudointermedius* isolado de cães e gatos. *Enterococci* resistente à vancomicina, Enterobacterias produtoras de carbapenemases e bactérias Gram-negativas beta-lactamase de espectro estendido chamadas de ESBL, responsáveis pela ameaça à saúde humana (POMBA et al. 2017).

Associado esse efeito bacteriano de adquirir resistência, outras capacidades evolutivas de proteção foram incorporadas. Elas conseguiram se comunicar e organizar em comunidades, de complexidades variadas e com poder de adesão a diferentes superfícies, dando origem a rede chamada de biofilme (KASNOWSKI et al. 2010). Esse fenômeno ocorreu de maneira natural, estruturado, ordenado e dinâmico, envolvendo etapas (ROZEN, et al. 2001; HALL-STOODLEY et al.2004) com o intuito de manter vivos e protegidos os envolvidos nessa relação (KASNOWSKI et al. 2010).

Seu principal mecanismo de ação é seu poder de fixação e proliferação em diferentes superfícies como: sistemas hídricos, solos, instrumentos hospitalares, válvulas cardíacas, cateteres, feridas crônicas, tecido pulmonar, cavidades dentárias, epitélios, plásticos e aço inoxidável, que corresponde à primeira etapa com as ligações intercelulares que acontecem nas superfícies (DONLAN, 2001; LOPEZ; et al. 2010). O amadurecimento das relações microbiológicas é a segunda etapa, nela se observa replicação celular, formação de micro colônias e a comunicação entre as células (RUTHERFORD e BASSLER, 2012; TRENTIN et al. 2013). Que acontecem com a mesma ou diferentes espécies dando origem aos agregados celulares nas superfícies (STOODLEY et al. 2002).

Toda essa união é estruturada, organizada e protegida por uma matriz extracelular, que determinará seu potencial de tolerância aos antimicrobianos (PARSEK; GREENBERG, 2005). Por último tem-se o efeito dispersor de indivíduos da comunidade que garante que novas bactérias colonizem novas áreas e todo o processo de formação de biofilme se reinicie (PARSEK e GREENBERG 2005), desempenhando um papel importante na constância de infecções e doenças crônicas em humanos (COSTERTON et al. 1999; STOODLEY et al. 2002).

Conhecer esses mecanismos de proteção dos patógenos é necessário para tentar evitar esse acelerado movimento de resistência, e assim gerar estratégias de redução do uso de antibiótico, que se apresenta como principal motivo. Mas a ausência de interesse pelas indústrias farmacêuticas em lançar novos antimicrobianos é o segundo motivo, pois desde 2000 a introdução desses medicamentos apresentou-se de forma lenta. Então por décadas vem se usando os mesmos antibióticos, intensificando o processo de seleção bacteriana (LIMA et al. 2017).

## **2.2 Bactérias de importância para a saúde pública**

As doenças infecciosas que são transmitidas entre animais e humanos, com participação ou não de vetores são chamadas de zoonoses. Dentre os agentes causadores de doenças em humanos existem mais ou menos 1500 onde 61% deles envolvem doenças zoonóticas de importância para a saúde pública (TAYLOR e LATHAM, 2001). No Brasil a primeira a ser

considerada zoonose foi a raiva por isso, em 1973 foi criado o primeiro Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, com as participações da vigilância e notificação de casos em humanos e animais domésticos e silvestres (MORAES et al. no prelo).

Outras doenças foram sendo estudadas, como o HIV que começou com sua transmissão entre o homem e animais, posteriormente se transformaram em cepas somente humanas. Surtos recorrentes de doenças infecciosas são comuns, como a doença do vírus ebola (OMS, 2021). Outro caso viral mais recente ainda em estudo é o novo corona vírus que teria sua origem de uma modificação de um vírus da família do corona vírus, com grande potencial, o COVID-19 foi capaz de causar uma pandemia (YOUNG e SIMPSON 2020).

As doenças zoonóticas bacterianas recebem um atenção maior nesse contexto, por apresentarem uma vasta capacidade de transmissão (GLASER et al.1994) como: a transferência por mordidas e arranhões dos animais (ZAMBORI et al. 2013), pela via alimentar através de produtos de origem animal contaminados, manuseio errado de alimentos em sua preparação (TAUXE et al.1997). Além dos profissionais da saúde animal que estão em contato direto e podem se tornar portadores de bactérias zoonóticas e transmitir para outros humanos e animais (RASCALOU et al. 2012). O ambiente como solo e água, também são fatores de risco e considerados grandes piscinas de genes de resistência que podem ser transferidos entres as bactérias e causarem doenças em humanas (SCHAUSS et al. 2009).

Entre as doenças infecciosas bacterianas de caráter zoonótico a salmonelose que é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella spp.* (SANTOS et al., 2013), se encontram na lista das principais de importância para a medicina veterinária e para a saúde pública. Pois são frequentemente transmitidas por mamíferos, répteis e aves (RENCTAS, 2014) e ocasionam perdas econômicas na produção animal e na comunidade (MOLINA et al., 2011).

Assim, como exemplos de bactérias Gram-positivas estão os gêneros *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Streptococcus spp.*, e entre as Gram-negativas encontram-se as *Pseudomonas spp.* e *Klebsiella spp.*, como

possíveis agentes causadores de afecções graves acarretando na morte de animais e grandes perdas econômicas na produção de alimentos. Essas manifestam um maior predomínio de resistência aos principais antibióticos de rotina clínica (GUIMARÃES et al. 2017; CORSINI et al.2020; PALMA et al. 2020).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, representado por 33 espécies e 17 delas já isoladas em amostras biológicas. Essas bactérias se apresentam em formato de cocos isolados, pares, reunidos em cadeias curtas ou agrupados irregularmente. Não se locomovem e são aeróbios facultativos, além de serem produtoras da enzima coagulase (KONEMAN et al. 2001; CASSETTARI et al. 2005). Conhecidas como comensais, colonizam mucosas e narinas (OTTO, 2009), no entanto, algumas cepas são responsáveis por causar doenças infecciosas em humanos e animais domésticos (NORMANNO et al. 2007). Nestes são encontrados principalmente na pele e mucosas tornando-se causadores de doenças dermatológicas importantes (MILLER et al. 2013).

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos em humanos (ALEGRE et al. 2016, MAGILL et al. 2018), frequentemente relacionado a infecções como: osteomielite, pneumonia, meningite, endocardite, intoxicação alimentar, afecções urinárias, sepses e síndrome do choque tóxico (BALABAN et al. 2000; KONEMAN et al. 2001), além de ser constantemente a espécie causadora de infecções principalmente em berçários e unidades de terapia intensiva (UTIs) (BALABAN et al. 1998; CAVALCANTI et al. 2005).

Pertence a microbiota da pele, intestinal e a sua colonização das fossas nasais é de grande importância, pois torna os indivíduos portadores assintomáticos, grandes veículos de contaminação do ambiente, por meio do mecanismo de infecções por contato (CARVALHO et al. 2005; CALVACANTI et al. 2005; ALMEIDA et al. 2016).

Sua patogenicidade é acentuada por sua capacidade de produzir o biofilme, além da ação das toxinas e enzimas como a catalase, coagulase, hialuronidase, fibrinolisinases, lipases, fosfatases, que auxiliam para o aumento da virulência bacteriana (KONEMAN et al. 2001; APOLINÁRIO et al. 2021). No entanto, esses fatores não se encontram em todas as cepas (BALABAN

et al., 2000; KONEMAN et al. 2001). Assim como sua capacidade de resistência aos antibióticos, que tem sido adquiridas por meio de mutações ou aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou de outras distintas (LIMA et al. 2005).

Considerada internacionalmente como uma das bactérias mais envolvidas nas infecções associadas à pele, glândulas e mucosas de animais tornaram-se importantes na medicina veterinária (SILVA et al. 2017). Na produção de alimentos de origem animal como os carnes destinados ao consumo, queijo bovino, leite e outros produtos (CUNY et al. 2010; DE BOER et al. 2009) é constante a propagação e contaminação dos produtos e seus derivados com o *Staphylococcus aureus*, responsável por causar infecções alimentares (CRETENET et al. 2011; REIS et al. 2013), assim como a contaminação que acontece por manipuladores de alimentos (LAMBRECHTS et al. 2014; HO et al. 2015). Tornando-se fonte de prejuízo econômico na agropecuária e por causar doenças bacterianas na criação de gado, principalmente leiteiro, aves e suínos (COSTA, 2002).

Por sua capacidade de integração e adaptação ao meio ambiente aos humanos e animais, somados a resistência os transformam em um grande problema de saúde pública (BARRERA-RIVAS et al. 2017).

O *Staphylococcus epidermidis* pertence ao grupo de estafilococos com enzima coagulase negativa, que se difere do *S. aureus* por essa característica particular (KONEMAN et al. 2001; OTTO, 2009; ALNAKIP et al. 2019). Atualmente é considerado um importante agente oportunista e causador de afecções nosocomiais tornando-se o maior responsável por infecções sanguíneas, endocardite e osteomielite, além de infecções das vias urinárias (ANVISA, 2014; NNIS, 2004).

Apresenta alta taxa de resistência aos antibióticos (OTTO, 2009) graças a sua capacidade de produção de biofilme e algumas cepas terem caráter hemolítico que lhes garante atividade neurotóxica, resposta inflamatória severa e capacidade de invadir tecidos dérmicos (GOGUEN et al. 1995). Somado a essas características, torna-se um reservatório de genes de resistência que são transferidos a outras bactérias, o que aumenta a importância de estudos sobre esta espécie (MA et al. 2002; OTTO, 2009).

O *Staphylococcus pseudintermedius* pertence à família Micrococcaceae é indicado como o principal agente causador de afecções do trato urinário de pele e ouvido em pequenos animais (WEESE e VAN DUIJKEREN, 2010; BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012; MILLER et al. 2013). Gram-positivo em formato de cocos que se agrupam na forma de cachos de uva (BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012). Colonizam normalmente a microbiota da pele e mucosa de animais, sendo mais encontrado nas regiões de: virilhas, região perianal, narinas e na cavidade oral de animais. Entretanto, em algumas situações favoráveis se torna uma bactéria oportunista, acarretando doenças como abscessos dermatológicos (WEESE e VAN DUIJKEREN, 2010).

Essas situações são originadas por causas como as alergias, processo de disqueratinização, doenças hormonais como hiperadrenocorticismo e hipotireoidismo, que alteram as estruturas da pele e, por consequência, leva a um estado de infecção da pele (HINILICA, 2012; MILLER et al. 2013).

Dentre as bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* pertencente à família Pseudomonadaceae e ao gênero *Pseudomonas* compreendendo mais de 100 espécies. São bacilos aeróbios estritos, não fermentadores e a maioria apresenta motilidade através de um ou mais flagelos polares (TRABULSI et al., 1999; KONEMAN et al., 2001). Bactérias Gram-negativas dispõem de uma membrana externa que caracteriza como a primeira linha de defesa (NIKAIDO, 1994).

Possuem a capacidade de colonizar diferentes ambientes como solo, água, animais, e na medicina humana tornou-se um importante agente causador de infecções oportunistas em pacientes hospitalares, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (PELLEGRINO et al. 2002; FIGUEIREDO e MENDES et al. 2005; NICASTRO et al. 2009). Encontradas no trato respiratório, urinário e de feridas crônicas de pele (CHILDERS et al. 2013).

Por apresentar diversos fatores de virulência, como os lipopolisacarídeos, exotoxina A, aumento da viscosidade extracelular, proteases, fosfolipases e outras enzimas, ela se torna a maior bactéria de importância (KONEMAN et al. 2001). Além do seu grande potencial de

produção de biofilme, que lhe confere maior resistência aos antibióticos (CHILDERS, et al. 2013).

A *Escherichia coli* são bacilos Gram-negativos, da família Enterobacteriaceae, encontradas amplamente na natureza, habita intestinos humanos e dos animais, seja como membros da microbiota normal (TRABULSI, 1999), ou como algumas cepas que são patogênicas intestinais, que acarretam em gastroenterites e colites quando ingeridas em quantidade suficiente (KAPER et al. 2004). No entanto, existem sorotipos chamados de *E. coli* extra-intestinais, que podem causar infecções como sepses e meningites (CONCEIÇÃO, 2010).

Também é considerada um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos no mundo (PINTO et al. 2004; OMS, 2015) e são frequentemente isoladas em infecções ocorridas em unidades hospitalares (YOUSSEF, 2000) e entre idosos internados (ANNE et al. 1987).

## **2.3 Plantas da Família Fabaceae**

### **2.3.1 Gênero Clitória**

A *Clitoria fairchildiana* é uma das plantas mais importantes dentre as lenhosas que são encontradas em diversos ecossistemas da Amazônia (DUCKE e BLACK, 1953). Pertence à família Fabaceae comuns em regiões tropicais da América do Sul e Caribe (SILVA, 2002; RANDO e SOUZA 2015) possui a maior diversidade de espécies, juntamente com a família das Orchidaceae que ficam em primeiro plano (FORZZA et al. 2010).

É uma espécie muito usada na arborização urbana, como parques, jardins, estradas e zonas rurais, por proporcionar área de sombras. São frondosas em suas copas, possuem tamanho médio a grande, com flores violáceas muito atraentes (SILVA, 2008; COSTA, 2011).

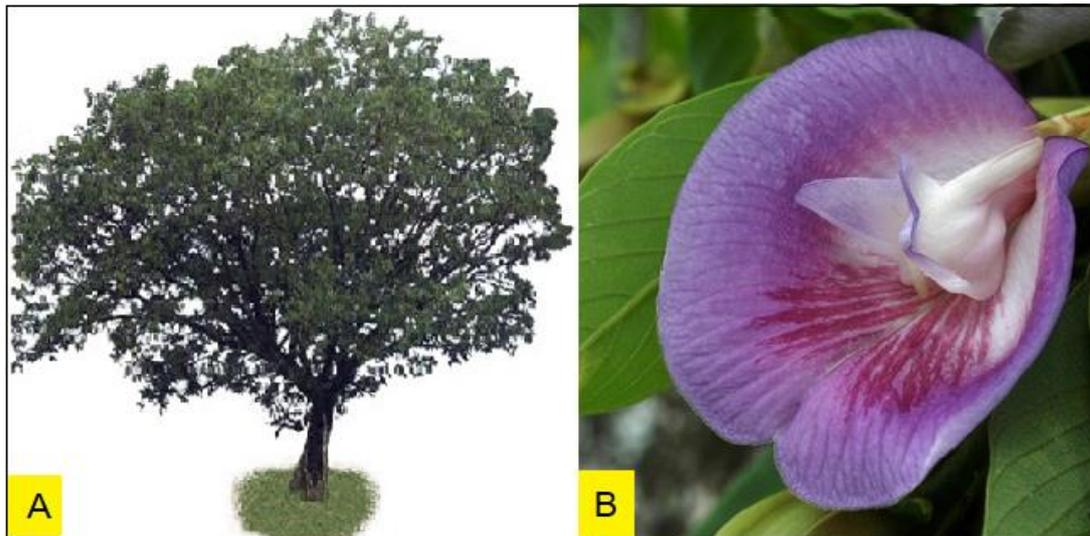


Figura 1: **Letra A** Sombreiro adulto, **Letra B** flora da *Clitoria fairchildiana*  
(Fonte: <https://arvoresdaufmt.wixsite.com/campusbosques/clitoria-fairchildiana>)

As sementes apresentam formatos planos e convexos, revestidas por tegumento castanho esverdeado, seus cotilédones são livres e funcionam como estruturas de reserva, dessa forma são bem semelhantes às sementes das leguminosas. Os frutos são mais retilíneos ou curvos, longos, secos e de coloração castanho, quando maduros (COSTA et al. 2014). Ilustrados na figura 2 abaixo.

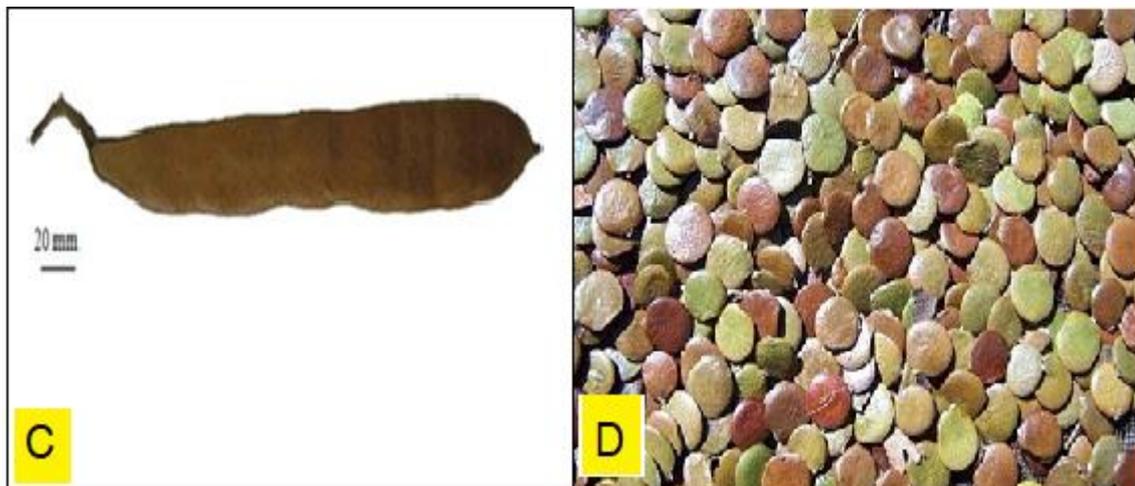


Figura 2 : Representação do fruto maduro, letra **C**; sementes letra **D** de *Clitoria fairchildiana*; (Fonte: Google imagens).

Sua madeira é pesada e de resistência mediana, por esse fator são muito usadas na construção de casas e realização de obras, confecções de brinquedos e caixotes (GUAJARÁ et al. 2003). Apresentam uma característica favorável, que é o rápido crescimento vegetal e assim podem

auxiliar em áreas de reflorestamento e recuperação de matas degradadas (LORENZI, 2008). Além de atuarem como adubo verde, fixando nitrogênio no solo (NOBRE et al. 2010)



Figura 3 : Folha da *Clitoria fairchildiana*

(Fonte: <https://arvoresdaufmt.wixsite.com/campusbosques/clitoria-fairchildiana>)

Algumas plantas desse gênero são usadas na medicina popular como a *Clitoria macrophylla*, para o tratamento de dermatoses e a *Clitoria ternatea*, também chamada de cunha ou feijão borboleta, que possui flores azuis-escuras ou brancas (ZAKARIA et al. 2018), muito usada como corante natural (MUHAMMAD EZZUDIN e RABETA, 2018), na alimentação humana e na nutrição de ruminantes, cobertura vegetal e ornamentação ( GUPTA et al. 2010).

Dentre suas utilizações, as ações medicinais também são relatadas, principalmente após detectarem a presença de bioativos de efeito anti-inflamatórios que auxiliam em infecções pulmonares (SHYAMKUMAR e ISHWAR 2012), além atuarem como antidepressivos, ansiolíticos, anticonvulsivantes e antipiréticos (SANTOS et al. 2016; MELO et al. 2018).

Essas ações terapêuticas foram presenciadas com os flavonoides, especialmente os rotenoides isolados da espécie *C. fairchildiana*, que expressaram atividades anti-inflamatória e citotóxica (SILVA, 2002, SHYAMKUMAR e ISHWAR 2012) e as descrições de suas propriedades biológicas incentivaram ainda mais a pesquisa da espécie (SILVA, 2002). Então, foi possível observar nas sementes de *C. fairchildiana* a presença de inibidores enzimáticos com efeitos antinutricionais sobre larvas de insetos, que causam perdas agrícolas (DANTZGER et al. 2015), e inibidor de

atividades enzimas digestivas das larvas do 4ºestágio do mosquito *Aedes aegypti*, inseto de importância para saúde pública (OLIVEIRA et al. 2015).

#### **2.4 Planta do gênero Phaseolus**

Desse grande gênero é possível encontrar 55 espécies dentre elas a *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* que são comumente mais plantadas (DEBOUCK, 1993). O *Phaseolus vulgaris*: pertence à Família das Fabaceae ou Leguminosae (SANTOS e GAVILANES, 2008) é conhecido popularmente como feijão carioca em todo território brasileiro e mundial. Considerado a primeira escolha no mercado, o que torna o Brasil um grande produtor e consumidor mundial com 2,8 milhões de toneladas (FAO, 2015).

Em sua estrutura vegetal é possível verificar um sistema radicular desenvolvido e localizado superficial ao solo. O caule é formado por uma sucessão de nós e entrenós que manifesta pilosidade e coloração em alguns casos. Suas folhas são simples e opostas, também com pigmentação e pilosidade variadas. As flores estão dispostas em inflorescências racemosas, podendo ser brancas, róseas e violetas. Suas sementes são arredondadas ou elípticas, de tamanhos distintos e cores também (entre preto, bege, roxo, róseo, vermelho, marrom, amarelo e branco) sendo uniformes (cor primária) ou possuir estrias e manchas, apresentando brilho ou serem opacas (SILVA 1999).

No âmbito nutricional o feijão apresenta-se como uma boa e importante fonte de nutrientes proteicos como a lisina, carboidratos, fibras alimentares, complexos minerais, ferro e vitaminas B. Tornando-se uma alternativa alimentar, para a carne principalmente para a população de país em desenvolvimento (LIN et al. 2008; DORVINCILA et al. 2010).

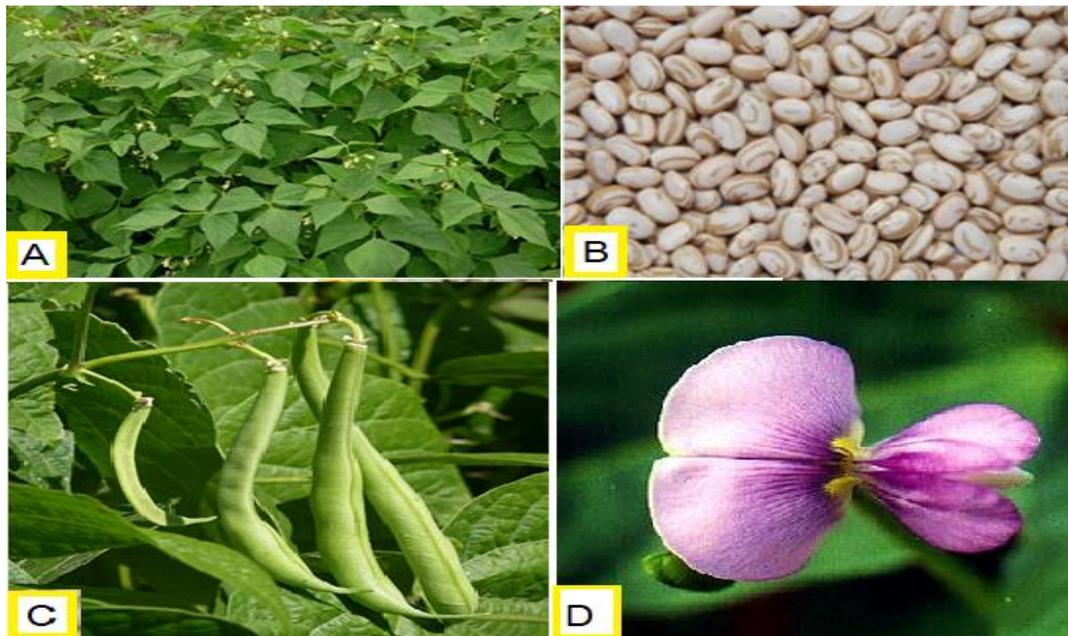


Figura 4: Características morfológicas do *Phaseolus vulgaris*; Letra **A**: folhas e planta adulta; **B**: sementes e forma do legume; **C**: forma e cor dos frutos; **D**: Cor da flor.  
(Fonte: Phaseolus vulgaris Images google)

Mesmo demonstrando 20 a 25% de proteínas em sua constituição, o feijão apresenta níveis inferiores de aminoácidos e uma alta resistência à proteólise. Isso acontece devido a grande parte proteica ficar armazenada na faseolina e lectinas. Essa é responsável pela presença da  $\alpha$ -amilase fitohemaglutinina (PHA), que desempenham funções de diminuição da digestão protéica, alterações tóxicas intestinais, mas são capazes de atuarem em ações benéficas (MONTROYA et al. 2006).

Assim como foi já encontrado na estrutura dos grãos do *Phaseolus vulgaris*, fibras inibitórias como a  $\alpha$ -amilase, componentes que auxiliam na prevenção e melhora da diabetes mellitus tipo II (HELMSTÄDTER, 2010). Além da presença de defensinas como relato por Games et al. (2008), que isolou e a caracterizou com atividade antifúngica. Algumas leguminas são conhecidas por possuírem metabólitos que desempenham importantes funções no seu desenvolvimento, são eles os flavonoides os principais compostos fenólicos (AGUILERA et al. 2010). Que atuam na resistência ao estresse, apresentam ação antioxidante, quelante de íons e como moléculas sinalizadoras que podem estimular o crescimento e desenvolvimento celular (MIERZIAK et al. 2014; KHALID et al. 2019).

## 2.5 Peptídeos antimicrobianos de origem vegetal

Durante todo o momento um ecossistema sofre mudanças com seus indivíduos, que passam por modificações e alterações que contribuem para preservar suas características e evoluir de forma adaptada as situações de estresse ambientais que estão sendo expostas. Essas mudanças acontecem também com os vegetais, que conseguiram desenvolver um mecanismo de defesa bem efetivo, contra causadores de danos como as pragas, bactérias, fungos, parasitas e insetos (ISHAQ et al. 2019)

Dentre essas ações, a criação de barreiras físicas, que evitam a penetração e disseminação de agentes, barreiras químicas para inibição de crescimento de patógenos, além de diferentes proteínas e compostos secundários que proporcionaram segurança são comuns (CAMPOS et al. 2018b). Algumas plantas com maiores alturas e tamanhos, possuem uma maior capacidade de defesa, principalmente contra efeitos físicos, químicos como poluentes e microrganismos patogênicos (STINTZI et al.1993).

Essa rede protetora, se caracteriza com a liberação de compostos químicos como fitoalexinas, taninos, polifenólicos e proteínas relacionadas à patogênese, chamadas de RP, que foram observadas pela primeira vez, em folhas de tabaco, em resposta a infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (SINHA et al. 2014; EBRAHIM et al. 2011). Além dessa propriedade antiviral, as plantas são capazes de liberar proteínas com ações antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e de inibição enzimática como chitinase e proteinase (SELS et al. 2008; SINHA et al. 2014).

Do grupo de moléculas químicas defensoras, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são comumente encontrados e fundamentais nas barreiras químicas (KULAEVA et al. 2020), são constituintes inatos do sistema imunológico de muitos seres vivos, desde microrganismos, animais até vegetais (ZASLOFF, 2019; KUMAR et al. 2018), proporcionando maior resistência contra agentes e patógenos externos (CAMPOS et al. 2018b).

Esses são derivados de moléculas sintetizadas no ribossomo celular, a partir de uma proteína maior chamada de precursora, que por um processo de lise, modificações e pós-tradução dá origem a um peptídeo maduro (TAM et al. 2015) ou também podem ser gerados por sintetizadores de peptídeos não ribossômicos (MUKHERJEE et al. 2011; TYAGI et al. 2019).

Dispõem de variações em suas arquiteturas, mas estão presentes componentes específicos e únicos que auxiliam no processo de identificação dos peptídeos (BROGDEN, 2005). Essa diferenciação pode acontecer principalmente através de modelos de suas estruturas secundárias, dividindo em três grupos esses AMPs: aqueles que adotam folhas- $\beta$ , com 6 - 8 cisteínas, que estabilizam com duas ou mais ligações dissulfeto; peptídeos que não possuem cisteína que adquirem formas anfipáticas em  $\alpha$ -hélice em presença da membrana do organismo alvo; peptídeos lineares ricos em triptofano, glicina, arginina, prolina e histidina (LEWIES et al. 2015). Ainda é possível encontrar alguns que não se enquadram nesses grupos e são chamados de AMPs circulares (VALE et al. 2014).

Outra forma de diferenciá-los é pela presença de suas cargas elétricas, como aqueles portadores de carga negativa (aniônicos/PAMAs) e de carga positiva (catiônicos/ PAMCs). Estes, em pH fisiológico, conseguem se ligar à superfícies negativas das membranas dos microrganismos (OMARDIEN et al. 2016), formando um escudo químico, dificultando a ação de inimigos externos e proporcionando uma ação antimicrobiana (CAMPOS et al. 2018b). Dentre as características dos AMPs, o tamanho menor é uma delas, assim como a conformação e composição com 15 a 100 resíduos de aminoácidos (FOX, 2013).

A taxa de moléculas hidrofóbicas em um peptídeo é chamada de hidrofobicidade e serve para diferenciá-los. Quando os valores estão elevados existem muitas moléculas hidrosolúveis nos peptídeos, os tornam solúveis em água e aumentam a capacidade de interação e permeabilidade das bicamadas lipídicas dos patógenos. Diferentemente da anfipacidade que também é usada para classificação em relação a regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos, em relação a sua conformação espacial e o poder de interação com microrganismos (KUMAR et al. 2018).

Através de suas propriedades particulares é possível entender os mecanismos de ação dos AMPs sobre os patógenos externos. A principal forma dos peptídeos antimicrobianos atuarem para destruir os agentes é pela permeabilidade da membrana, e com exceções eles conseguem matar os organismos, sem danificar as estruturas, apenas por atravessarem (LEWIES et al. 2015) as membranas celulares externa e interna de bactérias

Gram-negativas (BECHINGER e GORR, 2016) e por inibir atividades enzimáticas impossibilitando a síntese nucleica e proteica (SCOCCHI et al. 2016). Todos os mecanismos de atuação dos AMPs ainda não foram esclarecidos, no entanto, acredita-se que grande parte envolve a ligação deles à superfícies das membranas, devido a sua estrutura anfipática, que permite a penetração na bicamada lipídica e formação de poros que se fecham rapidamente, mas permitem a entrada das moléculas na célula (SCOCCHI et al., 2016; CHEN et al. 2017).

Dos peptídeos isolados dos animais, vegetais e microrganismos já foram relatados mais de 3.000 AMPs, dentre esses o grupo das plantas se tornou uma fonte rica e promissora por seus efeitos antimicrobianos contra patógenos humanos e dos próprios vegetais. Já foram descritos em quase todos os membros da família Rubiaceae e Violaceae, Curcubitaceae, Solanaceae e Poaceae e uma espécie da família Fabaceae, *Clitoria ternatea* (BURMAN et al. 2015; POTH et al. 2011). E sua extração e produção podem ser realizadas a partir de diferentes composições das plantas como: as folhas, raízes, sementes, flores e caules (TAM et al. 2015; WANG et al. 2016).

Os peptídeos vegetais possuem diferenciação em relação aos grupos de suas composições estruturais como: as defensinas, tioninas, proteínas transportadoras de lipídeos e os peptídeos circulares conhecidos como ciclotídeos, que possuem ampla atividade inibitória sobre diversos organismos dentre eles bactérias, fungos filamentosos e leveduras, protozoários, insetos e vírus ( OJEDA et al., 2019; ZASLOFF, 2019).

Os ciclotídeos são produzidos pelas plantas e apresentam-se como moléculas aniônicas, pertencentes à família ciclotide. Possuem um tamanho maior com 28-37 aminoácidos ligados a uma coluna dorsal cíclica, composta por seis laços com 6 resíduos de cisteína cruzados e estabilizados por 3 ligações de dissulfeto, chamados de nós cistinos cíclicos (PRÄNTING et al. 2010; PRABHU et al. 2014). Esse tipo de composição estrutural confere alta resistência aos ciclotídeos, sobre as ações de desnaturação química, térmica ou proteolítica, tornando-os potenciais agentes terapêuticos (MEHTA et al. 2020) antivirais (SANGPHUKIEO et al. 2015), e agentes antibacterianos (PRÄNTING et al. 2010).

Apresentam a capacidade de romper membranas, sendo esse um dos mecanismos de ação, onde a fosfatidiletanolamina é o seu principal alvo de atuação (HENRIQUES et al. 2012), realizando esse processo com alta especificidade e seletividade (CAMARERO e CAMPBELL, 2019; QIAN et al. 2017). E desta forma, garantindo potencial biotecnológico como ação antibacteriana (FENSTERSEIFER et al. 2015; SLAZAK et al. 2018), inseticida (CRAIK, 2012), moluscicida (PLAN et al. 2008) e anti-helmíntica (MALAGÓN et al. 2013) .

Todas essas particularidades tornaram os peptídeos antimicrobianos um grupo mais visado em estudos para fins terapêuticos por estarem presentes e em maior quantidade na natureza (LEWIES et al. 2015). Se tornaram alternativas para os antibióticos usados em doenças causadas por bactérias resistentes em humanos, pela capacidade de interação com biofilmes bacterianos já que esses são moléculas aniônicas e os AMPs são catiônicos (BHATTACHARJYA et al. 2009; HILCHIE et al. 2013). Outro fator importante é o poder de se ligar à superfícies bacterianas sem causar danos às membranas humanas, tornando-os mais seguros ao uso na medicina (ABOYE et al. 2015; KERENGA et al. 2019). E como alternativa futura e segura ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, que acarretaram na seletividade de bactérias e contaminação dos produtos derivados e, conseqüentemente, os humanos (BEN et al. 2019). Os peptídeos podem ser adicionados a nutrição, pois não alteram características físicas ou químicas dos alimentos e garantem atividade antimicrobiana mesmo em concentrações menores (AHMED e HAMMAMI 2019).

### **3 Objetivos**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos vegetais da folha de *Phaseolus vulgaris* e da folha de *Clitoria fairchildiana*, sobre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus pseudointermedius*, assim como a Gram-negativa *Escherichia coli*, que se apresentam como grandes causadoras de doenças infecciosas graves na veterinária e em humanos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a presença de atividade antibacteriana dos extratos vegetais da folha de *Phaseolus vulgaris* sobre bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus pseudointermedius* e a *Escherichia coli*.

- Avaliar a presença de atividade antibacteriana dos extratos vegetais da folha de *Clitoria fairchildiana* sobre bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus pseudointermedius* e a *Escherichia coli*.

- Verificar efeitos sinérgicos dos antibióticos amoxicilina com clavulanato, cefalotina, gentamicina, oxacilina e vancomicina, sobre as bactérias Gram-positivas tratadas com os extratos da folha de *Phaseolus vulgaris* assim como verificar para o extrato da folha de *Clitoria fairchildiana*.

- Verificar efeitos sinérgicos dos antibióticos amoxicilina com clavulanato, ciprofloxacino, gentamicina, tetraciclina e imipenem, sobre a bactéria Gram-negativa, tratada com o extrato da folha de *Phaseolus vulgaris*, assim como verificar esse efeito sobre o extrato da folha de *Clitoria fairchildiana*.

#### **4.0 Justificativa**

A utilização de forma descontrolada de antimicrobianos por décadas na medicina e na veterinária garantiu que microrganismos entrassem em contato direto com esses medicamentos que gerou uma pressão seletiva biológica de resistência. Dando origem ao fenômeno de bactérias resistentes, que se tornou uma ameaça à vida humana e dos animais (WANG, 2015).

As atividades agropecuárias estão dentre as principais causadoras desse processo, sabe-se que o consumo proteico animal mundial é crescente e que até 2017 aumentou em 35% (MULDER, 2019). Esse fato representa toda a estimulação comercial no processo de produção animal para que toda a demanda futura seja atendida. Para que isso aconteça são usados antimicrobianos e praguicidas nas áreas de criação evitando a degradação de áreas nativas (SAATH e FACHINELLO, 2018), no entanto, contamina com seus resíduos os solos, águas e os alimentos produzidos, estimulando o aparecimento de microrganismos multirresistentes nesses ambientes (BASTOS et al. 2019; BRILHANTE et al. 2019). Assim como sua utilização prática no controle de doenças infecciosas e como promotores de crescimento na produção animal (MARSTON et al. 2016).

Associado a essas atividades, fenômenos naturais também são responsáveis pela seleção microbiana. Como algumas mudanças climáticas que causaram destruição de áreas nativas e perda de suas biodiversidades, estimulando o aparecimento de agentes modificados evolutivamente e, conseqüentemente, doenças infecciosas emergentes como a, influenza aviária H1N1 e H5N1 (WALTNER TOEWS, 2017; WELBURN et al. 2015) e a COVID-19 que causaram pandemias mundiais (BONILLA-ALDANA et al. 2020), calculando um gasto de 1 trilhão de dólares até 2015 com 11 milhões de mortes por esses microrganismos potentes (NGUYEN-VIET et al. 2017).

Afim de, sanar ou amenizar, a ciência busca por desenvolvimento em alternativas com novas substâncias, que não sejam reconhecidas pelos mecanismos de defesas bacterianos e que apresentem distintas aplicações ao combate a infecções das cepas multirresistentes. O uso de peptídeos antimicrobianos isolados de vegetais o torna um grande promissor para superar essas adversidades, com estudos e conhecimento de suas

propriedades, criações de AMPs sintéticos, vão permitir o surgimento de novos compostos agrônômicos e farmacológicos, que causem danos menores ao meio ambiente e à saúde dos usuários (CAMPOS et al. 2018b; PORTO et al. 2018). Garantindo a conservação da biodiversidade e ajudando a conter doenças infecciosas (WOOD et al. 2014).

No entanto, essas tarefas além de serem extremamente desafiadoras são de suma importância devido à crescente emergência da situação e se faz necessária a cada dia.

A *Clitoria ternatea* é uma espécie pertencente à família das Fabaceas, reconhecida por apresentar ciclopeptídeos de suas raízes, folhas, caules, sementes e flores (NYGUEM et al 2011; POTH et al., 2011a,b) e por fazer parte da lista de vegetais que auxiliam no tratamento da covid (MAITY et al., 2012). Propriedades antifúngicas também são relatadas (KAMILLA et al., 2009; SHAHID et al., 2009) e essa espécie foi comparada pela escassez de trabalhos com a *Clitória fairchildiana*.

Devido à raridade de pesquisas com essa espécie o trabalho buscou evidenciar, características inibitórias dessa leguminosa sobre bactérias de importância para saúde pública.

## **5.0 Material e Métodos**

### **5.1 Linhagem dos Microrganismos**

Para realização dos ensaios foram utilizadas a cepa da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC (25922) e Gram-positivas os *Staphylococcus pseudintermedius* ED99, *Staphylococcus epidermidis* ATCC (12228) não produtora de biofilme, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina ATCC (33591), todas pertencentes ao acervo do Laboratório de Sanidade Animal (LSA/CCTA/UENF), obtidas originalmente na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e a cepa *Staphylococcus pseudintermedius* Edd 99, gentilmente cedida pelo Professor Bruno Pena, da Universidade Federal Fluminense.

### **5.2 Amostras testadas**

Para os ensaios foram utilizados extratos vegetais produzidos e gentilmente cedido pela Profa. Valdirene Gomes, com a colaboração da Doutoranda Milena Bellei Cherene, do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos (LFBM), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

- Folha de *Phaseolus vulgaris* - [ ] de proteína 5590 (µg/ml) aquoso
- Folha de *Clitoria fairchildiana* - [ ] de proteína 20060((µg/ml) aquoso

### **5.3 Cultivo das Bactérias**

As bactérias usadas foram reativadas em placas de meio ágar sangue, acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubadas em estufa por 24h a 37°C. Em seguida foram repassadas em placas de meio ágar Mueller Hinton e incubadas em estufa por 24h a 37°C.

### **5.4 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano com extratos vegetais por microdiluição.**

Nesse ensaio foram testados dois extratos contendo peptídeos, sobre as bactérias Gram-positivas e negativas selecionadas para avaliar a atividade dos extratos sobre o crescimento ou não dos microrganismos selecionados. Em microplacas de 96 poços, avaliou-se cada cepa frente aos extratos distintos inicialmente. Para a realização desse ensaio foram

empregados métodos descritos pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) e Eloff, 1998, com modificações e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os inóculos foram reativados para as placas em ágar Mueller Hinton, incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. As soluções foram produzidas a partir desses inóculos em tubos de vidro, contendo 2,0ml de solução salina (NaCl 0,85), homogeneizadas em agitador e ajustadas à turbidez de 0,5 na escala McFarland, equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, segundo a leitura realizada pelo densitômetro Densimat. Em um tubo estéril com 10ml de caldo Mueller Hinton, foram adicionados 1111µl do inóculo preparado anteriormente e essa solução foi utilizada nos ensaios posteriores.

O preenchimento da microplaca se deu da seguinte forma: 100µl de caldo Mueller Hinton depositados nos poços de controles negativos, nos positivos foram adicionadas alíquotas de 100µl da solução de inóculo final (meio + inóculos bacterianos). Nos poços considerados brancos foram depositados, caldo Mueller Hinton sem inóculo e adicionado os extratos nas quantidades e concentrações citados na tabela abaixo.

Tabela 1: Diferentes concentrações dos extratos vegetais testados.

<b>Extratos Vegetais</b>	<b>[ ] inicial extrato</b>	<b>[ ] extrato</b>	<b>[ ] extrato</b>	<b>[ ] extrato</b>	<b>[ ] extrato</b>
<b>Folha <i>Phaseolus vulgaris</i></b>	800 µg/ml	400 µg/ml	200µg/ml	100µg/ml	50µg/ml
<b>Folha <i>Clitoria fairchildiana</i></b>	800 µg/ml	400 µg/ml	200µg/ml	100µg/ml	50µg/ml

(Fonte: Costa, 2021)

Por fim, os poços de fileiras seguintes que permaneceram vazios, foram preenchidos com alíquotas de 100µl de solução de inóculo final. Foi realizada então a diluição até  $10^{-5}$  e no último poço 100µl foi descartado. A microplaca foi armazenada em estufa a 37°C, por um período de 24 horas. Um desenho esquemático da distribuição dos componentes do ensaio na microplaca de 96 poços pode ser visto na figura 5 abaixo.

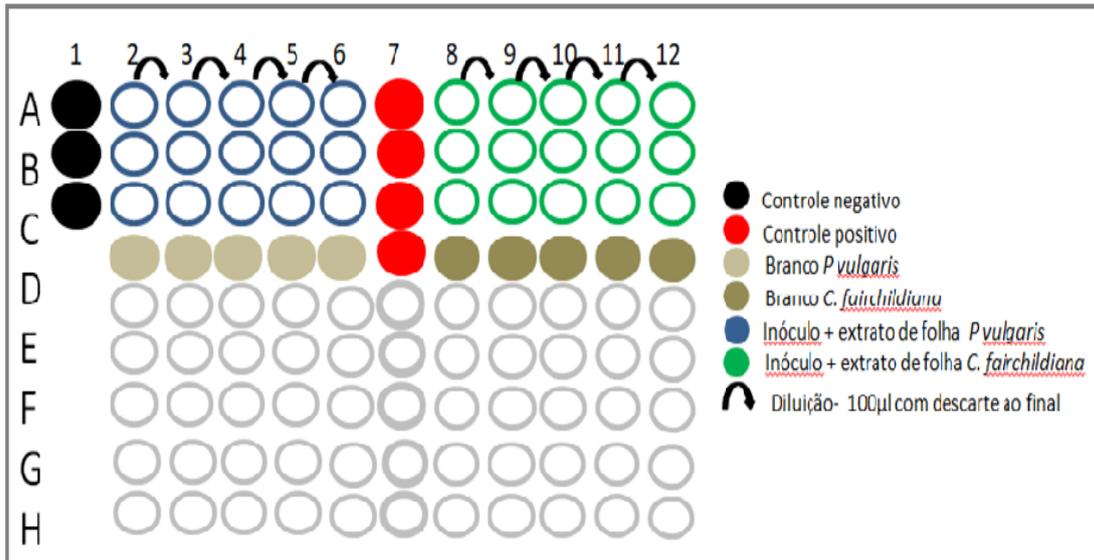


Figura 5: Representação da distribuição dos componentes do ensaio na microplaca de 96 poços. (Fonte: Costa 2021).

## 5.5 Leitura Espectrofotométrica

Após o período de incubação de 24 horas em estufa a 37°C, as microplacas foram submetidas à leitura de absorvância de 570nm, pelo leitor Multiskan FC (Thermo Scientific – Uniscience, EUA). O equipamento de leitura foi devidamente alocado em fluxo laminar para evitar contaminação dos testes nessa etapa de leitura. Os valores foram considerados para a confecção de gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos microrganismos segundo Freire et al. (2018).

## 5.6 Análise da viabilidade celular pela técnica de Spread-plate.

### 5.6.1 Seleção dos micropoços

Nessa avaliação foram selecionados os micropoços que apresentaram menor valor de absorvância na leitura em relação aos resultados do controle positivo de cada extrato analisado.

A primeira etapa do ensaio foi a diluição seriada na razão de 1:10 da amostra em análise utilizando solução salina (NaCl 0,85%) como diluente.

- Primeiro transferiu-se com o auxílio de um micropipetador estéril, um volume de 25µl (0,25ml) do inóculo do micropoço escolhido, para um eppendorf estéril com 225µl (2,25ml) de solução salina (NaCl 0,85%) estéril identificado como 10<sup>-1</sup>.

- Em seguida o conteúdo foi gentilmente homogeneizado por agitação do tubo da diluição  $10^{-1}$ , e transferiu-se com um auxílio de um micropipetador estéril um volume de 25 $\mu$ l (0,25ml) para outro tubo com 225 $\mu$ l (2,25ml) de solução salina (NaCl 0,85%) estéril identificado como  $10^{-2}$ .
- Sucessivamente foi realizada a homogeneização por agitação do conteúdo do tubo da diluição  $10^{-2}$  e transferido com um auxílio de um micropipetador estéril o volume de 25 $\mu$ l (0,25ml) para outro tubo com 225 $\mu$ l (2,25ml) de solução salina (NaCl 0,85%) estéril identificado como  $10^{-3}$ .

O procedimento de diluição seriado foi realizado até alcançar o resultado no tubo de diluição  $10^{-10}$  e assim, da mesma forma foram realizados os mesmos procedimentos para os controles positivos, negativos e todos em triplicatas.

### **5.6.2 Etapa do plaqueamento**

Foram confeccionadas as placas do controle positivo, negativo e de todas as diluições até a  $10^{-10}$  em triplicata e seguiu a seguintes etapas:

- As 10 placas de Petri de ágar Mueller Hinton foram enumeradas para a contagem de colônias. Em seguida homogeneizados por agitação o conteúdo dos tubos das diluições  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$ .
- Com um micropipetador estéril foi retirada alíquota de 100 $\mu$ l (0,1 ml) da diluição  $10^{-1}$  e cuidadosamente depositada no centro de uma placa, contendo agar Mueller Hinton.
- Com o uso de alça de Drigalski que estava imersa em álcool e flambada e esfriada, o material com o inóculo na placa foi espalhado por toda a superfície do agar de maneira uniforme, realizando movimentos em três direções como indicado na figura 6 abaixo, até a amostra secar completamente.

Posteriormente, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas e por fim realizada a contagem do número de colônias em cada placa, determinando o número de bactérias em UFC/mL. O processo foi repetido em todas as diluições como mostra à figura 7 a abaixo. As placas foram

mantidas vedadas e a alça de Drigalski mantida imersa em álcool, durante todo o procedimento experimental.

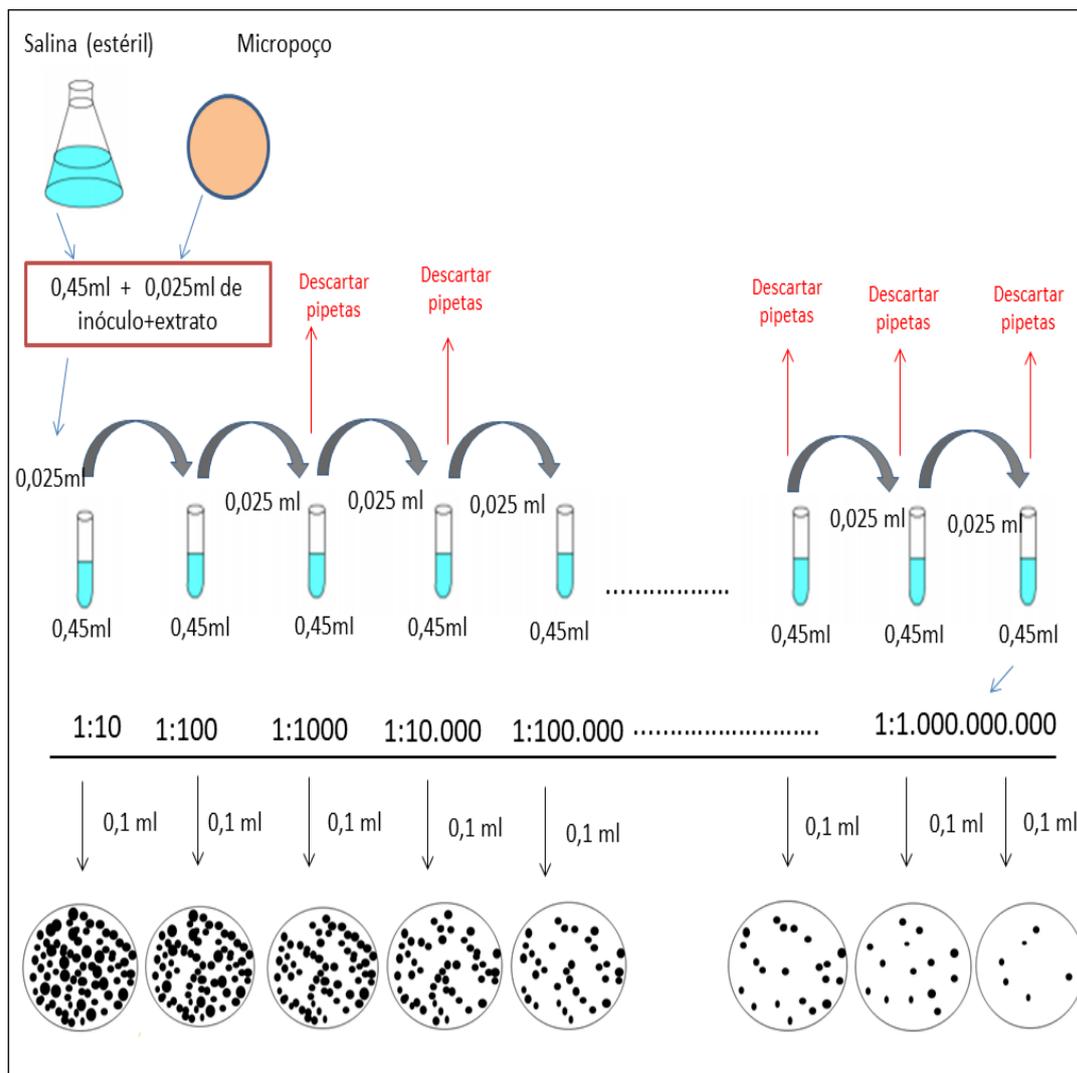


Figura 6: Representação esquemática das etapas da técnica de plaqueamento.

(Fonte: Costa, 2021)

### 5.7 Avaliação da interação de extratos, antibióticos e bactérias em ágar.

Nessa etapa foram testados os extratos da folha de *Phaseolus vulgaris* e da folha de *Clitoria fairchildiana*. Foram selecionados dentre os microrganismos anteriormente usados, o *S. aureus* e *E. coli* para os próximos ensaios. Os antibióticos foram testados de acordo com as instruções do CLSI (2012) para Gram-positivas e Gram-negativas, com intuito de verificar possíveis efeitos sinérgicos entre os produtos testados (SANTURIO et al. 2007).

Para a preparação da primeira etapa o ágar Mueller Hinton foi preparado e esfriado a uma temperatura de 40°, medido por termômetro. Em cada placa foi adicionado 20µl (200µg) do extrato de *C. fairchildiana* com 1980µl de ágar resfriado e levemente agitados para haver a homogeneização dos conteúdos. O mesmo foi realizado para o extrato de *P. vulgaris*, para as duas bactérias citadas anteriormente.

Os inóculos foram previamente preparados com bactérias isoladas e inoculadas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e ajustadas quanto a sua concentração celular por mililitro, com auxílio da leitura no fotômetro (Densimat, bioMérieux), alcançando o valor de 0,5 na escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Em seguida, com auxílio de um swab estéril embebido nessa solução, a placa preparada com o extrato foi semeada em sua superfície com as bactérias selecionadas, segundo, Nascimento et al., (2007) com adaptações.

Após o período de secagem foram acomodados sobre o ágar de forma organizada e espaçada os discos de antibióticos utilizados na rotina para *S. aureus* a amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, oxacilina, cefalotina e vancomicina. Para a *Escherichia coli* foram usados a amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, imipenem, ciprofloxacino e tetraciclina. Foram preparados como controles positivos os antibiogramas com os mesmos antibióticos analisados, para a bactéria Gram-positiva e para a Gram-negativa.

Ao final as placas foram incubadas por mais 24h a 37°C e após este período, foram medidos os halos formados com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil), e os resultados em triplicata, foram comparados aos valores dos controles positivos e analisados pela metodologia estatística de Anova.

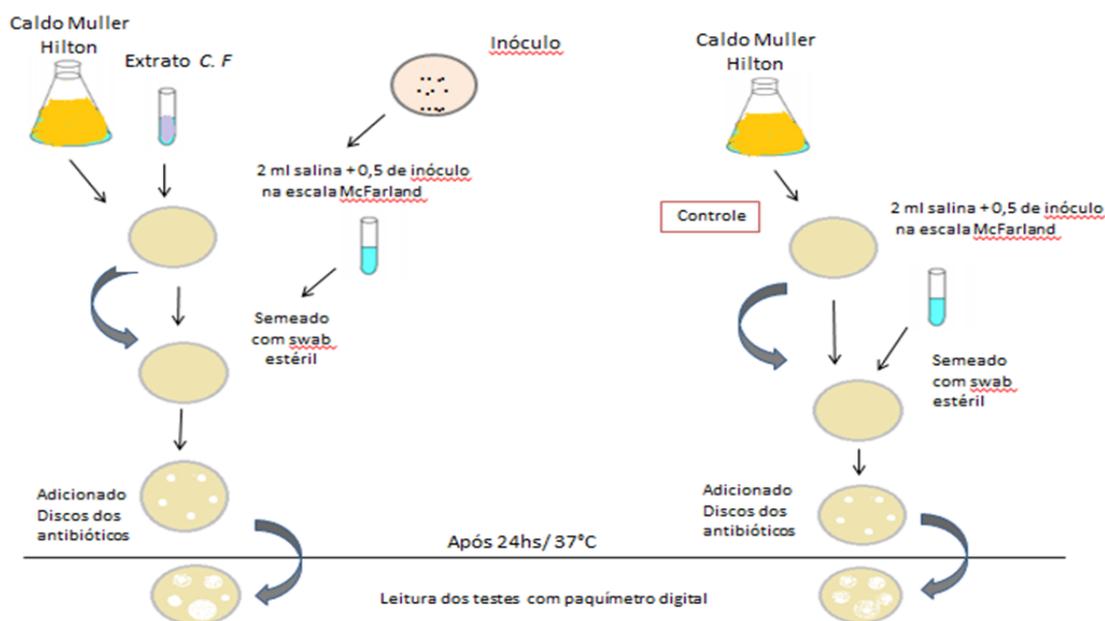


Figura7: Representação esquemática das etapas do teste de avaliação de sinergismo dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais. (Fonte:Costa 2021)

### 5.8 Avaliação de interação dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais.

Foram preparadas as soluções de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. ajustadas à turbidez de 0,5 na escala McFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Para o teste com o extrato de *C. farchildiana* os tubos de vidro foram preenchidos com 1980µL de caldo Mueller Hinton e adicionados 100µl de inóculo previamente preparado e mais o extrato nas concentrações de 200µg/ml. Também foram testadas nas concentrações de 400µg/ml e 800µg/ml com ajustes da quantidade dos meios para que o volume final do frasco correspondesse a 2000µl.

Para os testes com o extrato de *Phaseolus vulgaris* foram colocados 1930µl de caldo Mueller Hinton com 100µl de inóculo e mais o extrato na concentração inicial de 200µg/ml, 400µg/ml e 800µg/ml, com ajustes da quantidade dos meios para que o volume final do frasco correspondesse a 2000µl. Para controle positivo foram usados ágar com inóculos e para controle negativo foram tubos contendo ágar e apenas de extratos incubados a 37 °C por 24h em estufa, assim como os tubos de tratamento analisados.

Após este período, alíquotas de 100µL foram retiradas dos tubos controles e tratamento, transferidas para as placas de ágar Mueller Hinton e foram semeadas com auxílio de swabs estéreis. Em seguida os discos de antibióticos utilizados na rotina clínica, para Gram-positivas como amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, oxacilina, cefalotina e vancomicina e para as Gram-negativas usou-se a amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, imipenem, ciprofloxacino e tetraciclina, foram acomodados sobre o ágar de forma equidistante.

Por fim as placas foram incubadas novamente por mais 24h a 37°C e após este período os halos formados foram medidos com auxílio de um paquímetro digital (CLSI, 2017) ilustrados na figura abaixo. Foram seguidos os mesmo protocolos em triplicatas e os resultados foram comparados aos controles e analisados pela metodologia estatística. A técnica foi utilizada como Abrantes, (2017) e COSTA et al. (2010) com modificações.

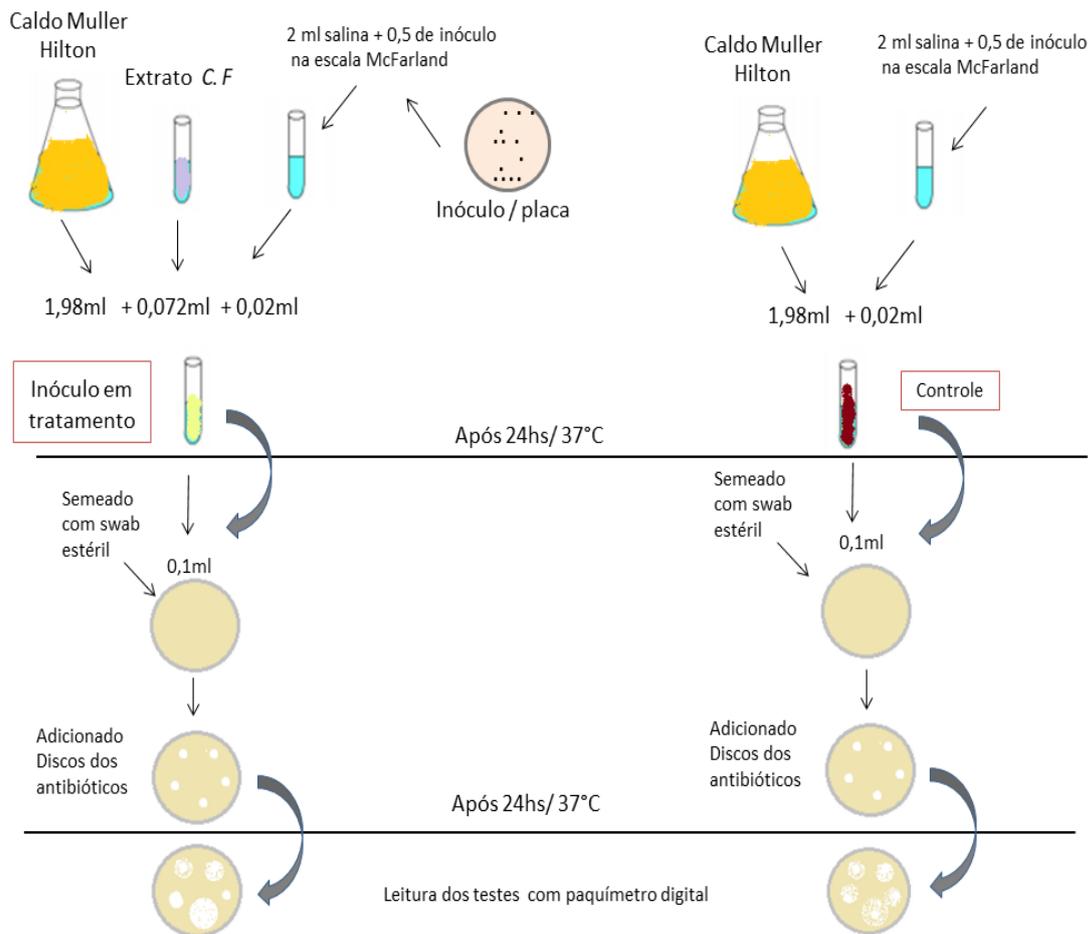


Figura 8: Representação esquemática das etapas do teste de avaliação da interação dos antibióticos em bactérias tratadas com os extratos vegetais (Fonte: Costa, 2021).

## 5.9 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica dos extratos de *Phaseolus vulgaris* e *Clitoria fairchildiana* testados, foi determinada pelo método de difusão em ágar contendo sangue desfibrinado de carneiro. Preparou-se o ágar BHA na proporção de 200ml para cada 100ml de sangue e as placas, foram confeccionadas com 20 ml do ágar. Após 24 horas para verificação de contaminação, foram realizadas 4 perfurações formando os poços de 5mm de diâmetro e a cada poço foram adicionados concentrações distintas de 200µg/ml; 400µg/ml; 600µg/ml; 800µg/ml para serem avaliadas. Após o período de 24h em estufa à 37°C, foram verificados a presença ou não de hemólise. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

## 6.0 Resultados

### 6.1 Teste de inibição de crescimento bacteriano em microplaca com extratos vegetais de *Phaseolus vulgaris* e *Clitoria fairchildiana*

Essa etapa foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, o material foi incubado por 24h em temperatura de 37°C e realizada a leitura pelo espectrofotômetro, para verificar a absorbância de cada extrato sobre as bactérias analisadas.

Inicialmente foram testadas as Gram-positivas como o *S. epidermidis* ATCC (12228), *S. aureus* ATCC (25923) e *S. pseudintermedius* Ed99, e como representante das Gram-negativas a *Escherichia coli* ATCC (25922). Todos os ensaios nas microplacas foram realizados com os dois extratos vegetais com concentrações iniciais de 800µg/ml e todos em triplicata. Na verificação da ação antibacteriana do extrato da folha de *Phaseolus vulgaris* sobre o *S. epidermidis* ATCC (12228), não foi possível observar resultados de inibição, pois os valores de leitura de absorbância não foram menores que o do controle positivo, independente das concentrações testadas. O assim como mostra o gráfico 1 abaixo.

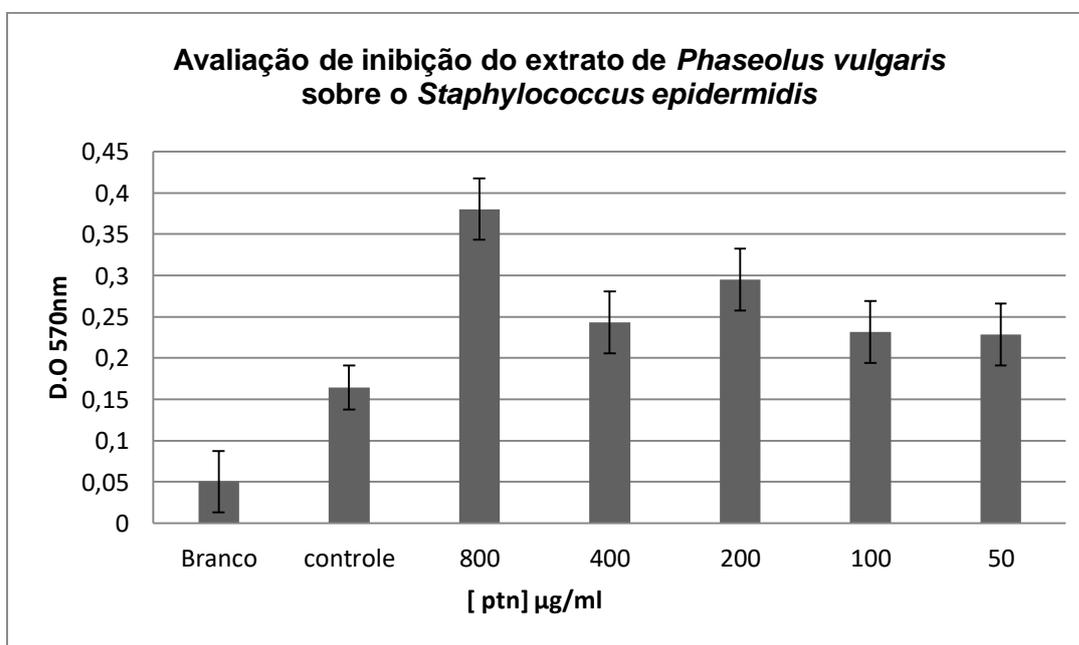


Gráfico 1: Valores de absorbância em diferentes concentrações do extrato de *Phaseolus vulgaris* sobre o *Staphylococcus epidermidis*. (Fonte: Costa 2021)

Assim como foi observado com o extrato de *Clitoria fairchildiana* sobre o *S. epidermidis* que apesar da concentração de 800µg/ml quase alcançar o

valor do controle, não houve inibição dentre as cinco concentrações de extratos testadas (gráfico 2).

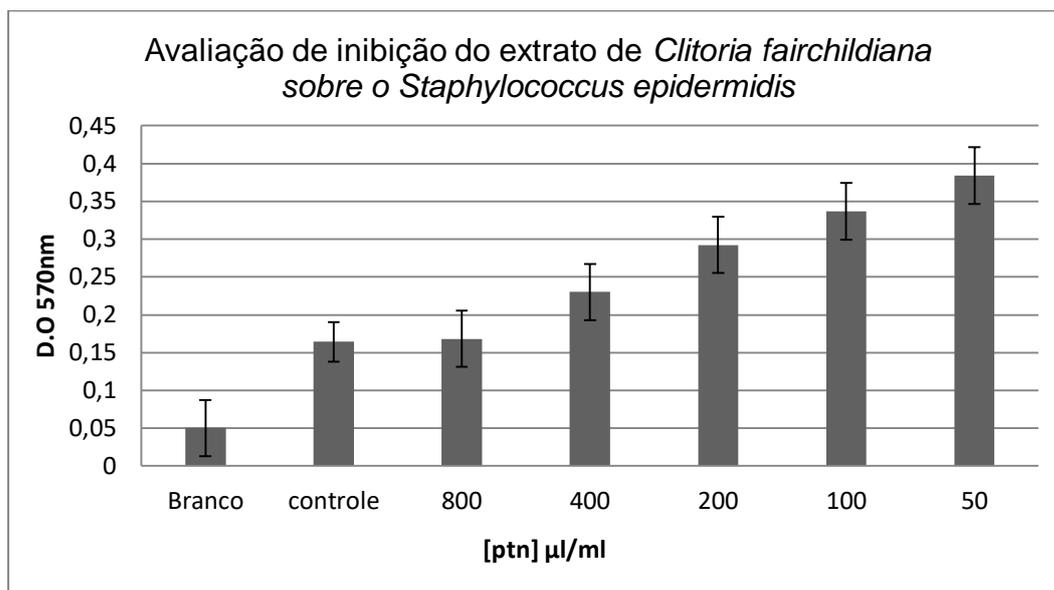


Gráfico 2: Valores de absorbância em diferentes concentrações do extrato de *Clitoria fairchildiana* sobre o *Staphylococcus epidermidis*.(Fonte: Costa 2021)

Na análise dos resultados para a bactéria *S pseudintermedius* Ed99 com o extrato da folha de *Phaseolus vulgaris*, não houve inibição de crescimento bacteriano, em nenhuma das cinco concentrações testadas, pela leitura de absorbância (gráfico 3).

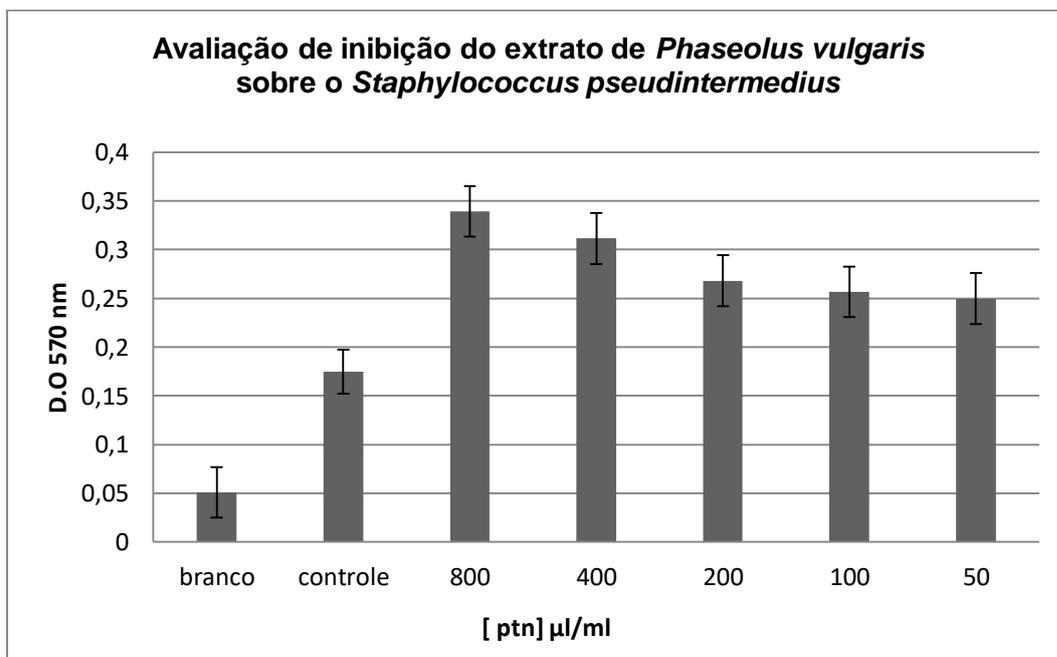


Gráfico 3: Valores de absorbância em diferentes concentrações do extrato de *Phaseolus vulgaris* sobre o *Staphylococcus pseudintermedius*.(Fonte: Costa 2021)

Como resultado da atuação do extrato da folha de *Clitoria fairchildiana* sobre o *S. pseudintermedius* Ed99, detectou-se que nas concentrações de 100ug/ml e 200ug/ml, foi possível verificar discreta ação antimicrobiana, mas não à nível de significância estatística, como mostra o gráfico 4 abaixo.

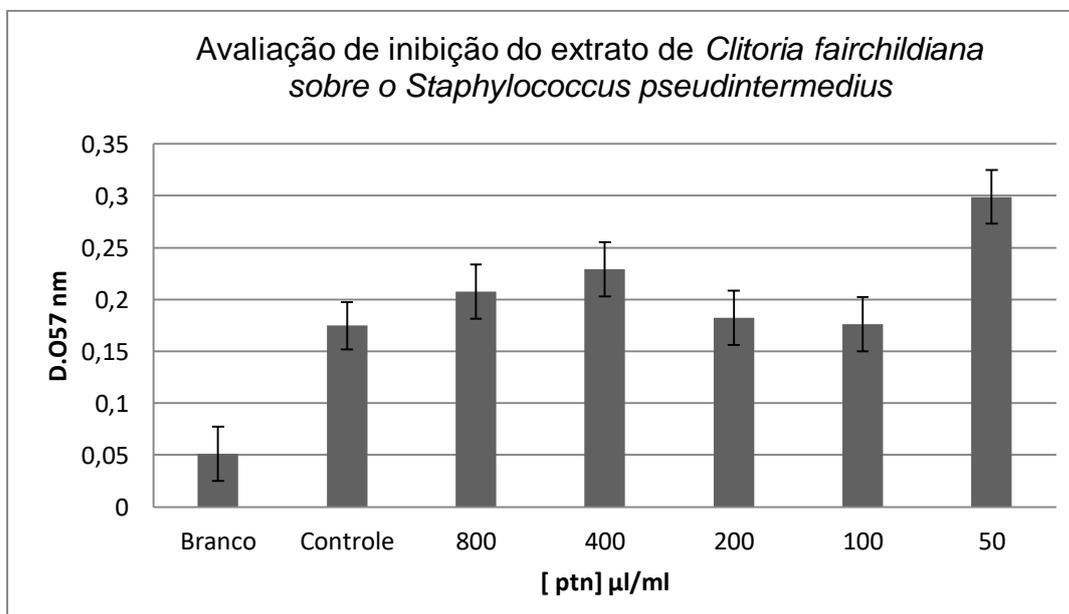


Gráfico 4: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de *Clitoria fairchildiana* sobre o *Staphylococcus pseudintermedius*. (Fonte: Costa, 2021)

Os dados obtidos no teste com o *S. aureus* sobre efeito do extrato de *P vulgaris*, não foi possível verificar inibição bacteriano (gráfico 5).

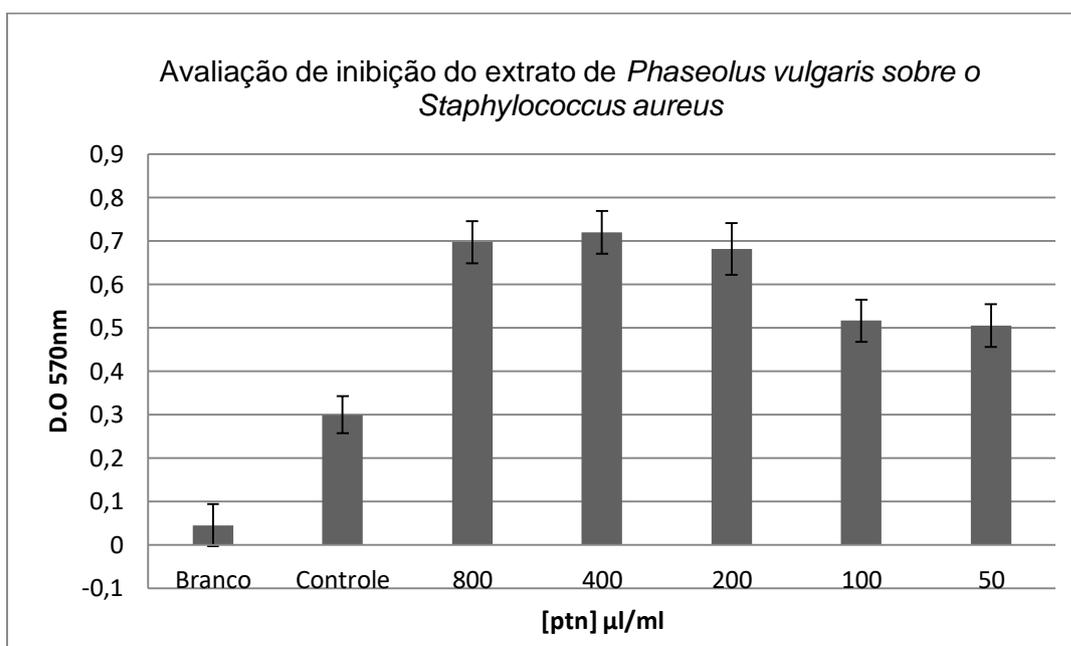


Gráfico 5: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de *Phaseolus vulgaris* sobre o *Staphylococcus aureus*. (Fonte: Costa, 2021)

Ao contrário do observado com o extrato de *Clitoria fairchildiana* que mostrou valores de absorvância menores que os controles, nas concentrações de 400ug/ml e 800 ug/ml mostrando se eficaz na inibição do crescimento bacteriano.

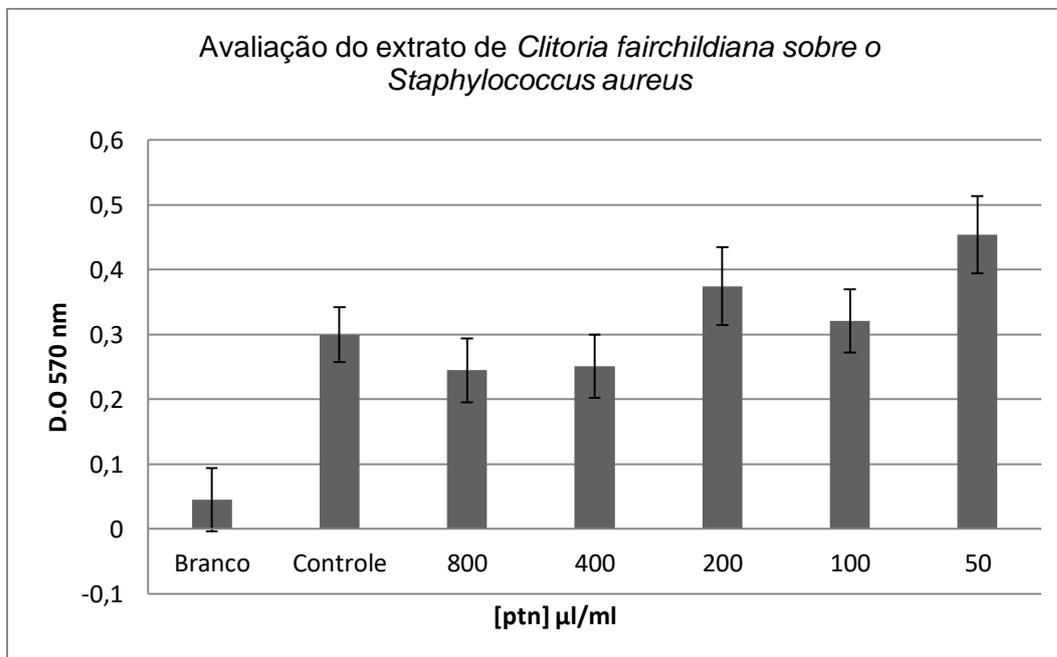


Gráfico 6: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de *Clitoria farchildiana* sobre o *Staphylococcus aureus* (Fonte: Costa, 2021).

Para o teste com a *E. coli*, resultados satisfatórios sobre ação do extrato da folha de *Phaseolus vulgaris* foi constatado na concentração de 800µg/ml, que foi possível inibir o crescimento bacteriano, que apresentou valores menores comparado aos do controle positivo, como mostra o gráfico 7 abaixo.

Para o extratado de *Clitoria fairchildiana* também foi observado que na concentração de 800µg/ml, houve inibição do crescimento, como mostra o gráfico 8 abaixo. Nas outras concentrações não foi possível verificar essa atividade.

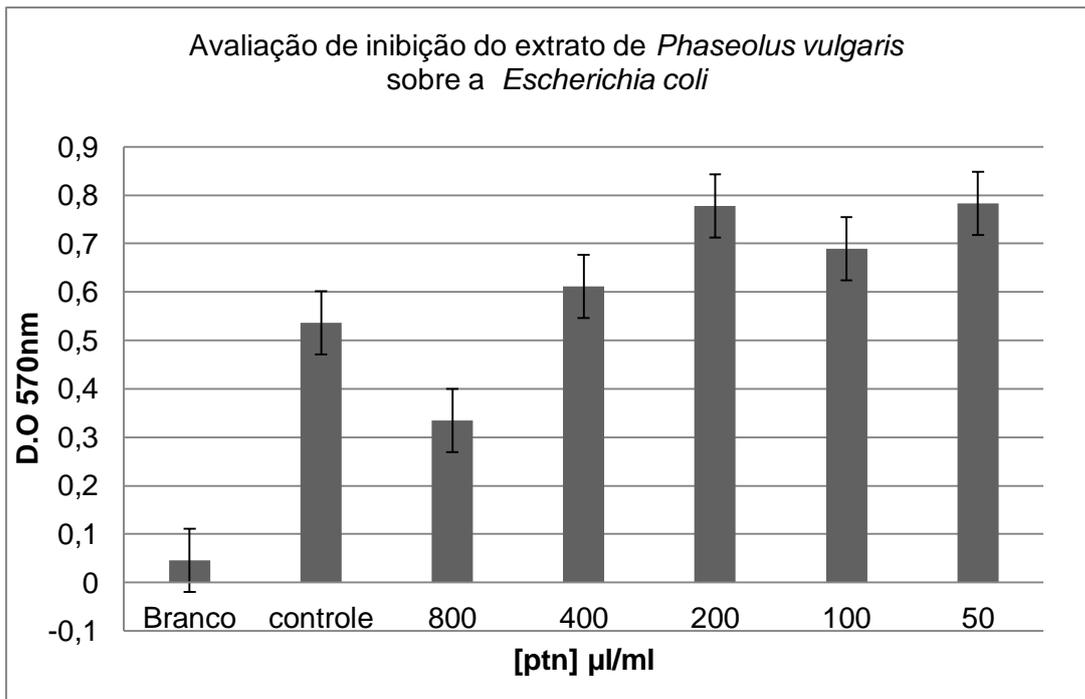


Gráfico 7: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de *Phaseolus vulgaris* sobre a *Escherichia coli*. (Fonte: Costa, 2021)

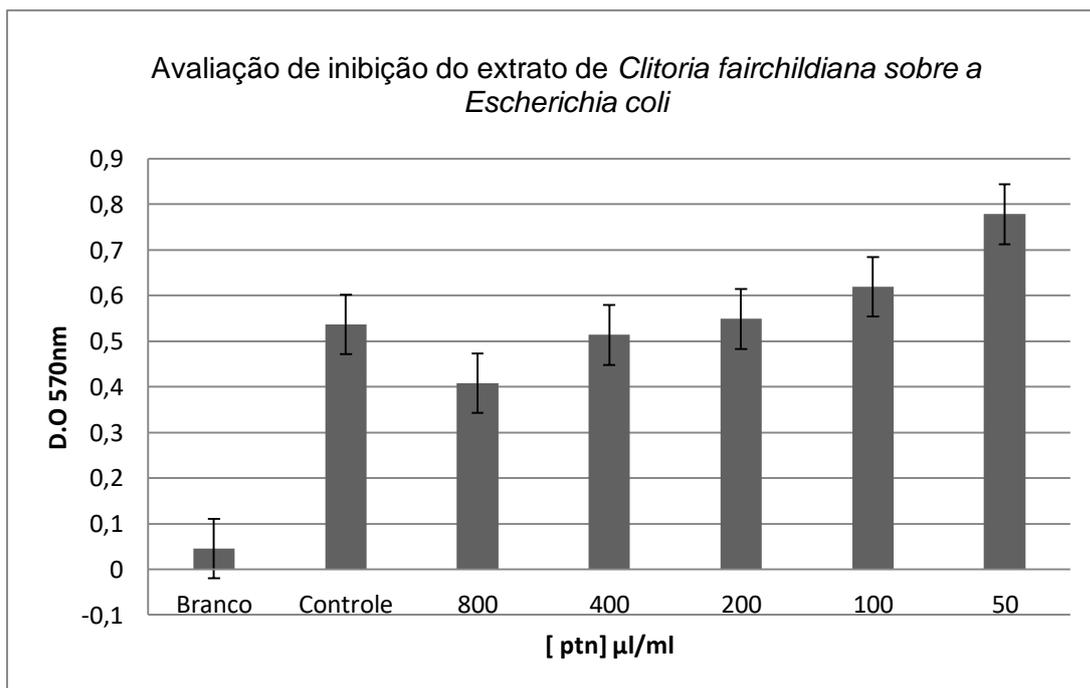


Gráfico 8: Valores de absorvância em diferentes concentrações do extrato de *Clitoria fairchildiana* sobre a *Escherichia coli*. (Fonte: Costa, 2021)

## 6.2 Resultados do teste de viabilidade celular

Os poços dos testes que apresentaram menores valores na leitura de absorbância foram escolhidos para realizar a etapa de verificação de viabilidade celular. A análise foi realizada pela técnica de microdiluições e o plaqueamento aconteceu depois de 24h de incubação em estufa a 37°C e após o crescimento das colônias, realizada a contagem. O plaqueamento foi feito em triplicata, e os valores são uma média das colônias das três placas comparadas ao controle positivo. Os dados deste experimento estão em consonância com os resultados do ensaio de inibição das microplacas de 96 poços.

Tabela 2: Resultado da viabilidade celular, pelas médias dos valores de contagem das colônias, comparadas as médias do controle positivo.

<b>Microrganismos</b>	<b>Microdiluição</b>	<b>Média C+</b>	<b>Média PE</b>	<b>UFC/ml</b>
<b><i>Staphylococcus epidermitis</i></b>	10 <sup>-7</sup>	255	333	3,3 x10 <sup>-8</sup>
<b><i>Staphylococcus pseudointermedius</i></b>	10 <sup>-7</sup>	259	266	2,6x10 <sup>-7</sup>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	10 <sup>-7</sup>	237	51	1,3x10 <sup>-6</sup>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	10 <sup>-7</sup>	>300	230	6,2x10 <sup>-6</sup>

(Fonte: Costa 2021)

Legenda da tabela 2: C+: Média do controle positivo; PE média do poço escolhido

## 6.3 Avaliação da interação de extratos de *Phaseolus vulgaris* e *Clitoria fairchildiana* com antibióticos sobre bactérias em ágar

As interações dos extratos testados e os antibióticos comerciais foram verificados, com o intuito de avaliar a capacidade dos extratos em aprimorar os efeitos destes medicamentos.

No resultado com a bactéria *S. aureus* no teste de interação com o extrato de *Clitoria fairchildiana*, foi possível verificar aumento discreto no tamanho dos halos de inibição dos cinco antibióticos testados, comparados

aos valores do controle, caracterizando um possível sinergismo entre eles. No teste com o extrato vegetal da folha de *Phaseolus vulgaris*, essa interação foi possível com quase todos os antibióticos testados, com exceção da gentamicina tiveram diferenças em seus valores de halos, como mostra a tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias dos extratos de *Clitoria fairchildiana* (C.F) e *Phaseolus vulgaris* (P.V), com a bactéria *Staphylococcus aureus*.

<b>Microrganismo</b>			
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>			
Antibióticos	Controle	[ ]200µg/ml C.F	[ ]200µg/ml P.V
<b>AMC</b>	38,01	<b>40,05</b>	<b>40,57</b>
<b>CFL</b>	42,23	<b>45,00</b>	<b>44,50</b>
<b>GEN</b>	21,10	<b>23,60</b>	20,73
<b>OXA</b>	22,53	<b>24,52</b>	<b>23,50</b>
<b>VAN</b>	25,51	<b>26,64</b>	<b>28,80</b>

(Fonte:Costa 2021)

Em relação ao resultado do teste com a cepa bacteriana de *E. coli* ATCC (25922), foi possível observar discretas diferenças entre as médias dos halos de inibição dos tratamentos com os controles. No entanto, com o extrato de *Clitoria fairchildiana*, observamos que os antibióticos ciprofloxacino, gentamicina, imipenem e tetraciclina tiveram seus halos aumentados, demonstrando interação entres eles, porém a amoxicilina com clavulanato não interagiu da mesma forma.

Para o tratamento da mesma bactéria com o extrato da folha de *Phaseolus vulgaris*, os antibióticos: gentamicina, imipenem e a tetraciclina também foram capazes de interagir, com aumento das médias das medidas dos halos de inibição, apresentando melhores resultados comparados a atuação da amoxicilina com clavulanato e do ciprofloxacino que não obtiveram esses resultados de estimulação, como mostra a tabela 4 abaixo. Os dados não foram significativos para a estatística.

Tabela 4: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias dos extratos de *Clitoria fairchildiana* (C.F) e *Phaseolus vulgaris* (P.V), com a bactéria *Escherichia coli*

<b>Microrganismo</b>			
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
<b>Antibióticos</b>	<b>Controle</b>	<b>[ ] 200µg/ml C.F</b>	<b>[ ] 200µg/ml P.V</b>
Amoxicilina + clavulanato	27,10	26,54	26,41
<b>Ciprofloxacina</b>	37,04	<b>40,00</b>	36,2
<b>Gentamicina</b>	<b>24,10</b>	<b>25,57</b>	<b>25,39</b>
<b>Imipenem</b>	<b>36,69</b>	<b>38,96</b>	<b>37,50</b>
<b>Tetraciclina</b>	<b>31,57</b>	<b>33,59</b>	<b>32,53</b>

(Fonte:Costa 2021)

#### **6.4 Resultados da avaliação de interação dos antibióticos com bactérias tratadas com os extratos vegetais de *Phaseolus vulgaris* e *Clitoria fairchildiana*.**

Nessa etapa as bactérias passaram por um processo de tratamento com os extratos por 24 horas em estufas à 37°C e depois foram depositadas em placas de Petri e posteriormente adicionados os discos dos antibióticos referentes as bactérias a serem testada. Dentre os resultados encontrados, do antibiograma padrão a cepa *S. aureus* ATCC (25923), apresentou sensibilidade a todos os cinco antibióticos testados.

Em relação aos ensaios do extrato de *Clitoria fairchildiana* com três diferentes concentrações e a cepa *S. aureus*, obteve-se como resultado um aumento das medidas dos halos de inibição, principalmente nos antibióticos: amoxicilina com clavulanato, gentamicina e vancomicina nas três concentrações testadas (calculada a média), havendo interação, mas não há nível de significância estatística. O antibiótico oxacilina apresentou menor valor de diferença entre as médias, mas teve efeito potencializado com o extrato. A cefalotina não demonstrou mudanças em suas médias, mostrando um efeito contrário do esperado, como mostra os dados na tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de *Clitoria fairchildiana* com a bactéria *Staphylococcus aureus*

Antibióticos	Médias das [ ] controle	Médias das [ ] C.F 200µg/ml-400µg/ml- 800µg/ml
<b>Amoxicilina +clavulanato</b>	<b>25,64</b>	<b>29,56</b>
Cefalotina	40,05	22,54
<b>Gentamicina</b>	<b>25,64</b>	<b>35,01</b>
<b>Oxacilina</b>	<b>17,77</b>	<b>18,30</b>
<b>Vancomicina</b>	<b>20,15</b>	<b>24,97</b>

(Fonte: Costa 2021)

Para o teste com *S. aureus* e o extrato de *Phaseolus vulgaris* encontrou um aumento das médias dos halos de inibição, caracterizando um efeito sinérgico com os antibióticos: amoxicilina com clavulanato, oxacilina e vancomicina nas três concentrações (calculada a média). No entanto, não houve essa mesma interação positiva com cefalotina e gentamicina representada por médias inferiores as do controle, como mostra a tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de *Phaseolus vulgaris* com a bactéria *Staphylococcus aureus*

Antibióticos	Médias das [ ] controle	Médias das [ ] P.V 200µg/ml- 400µg/ml- 800µg/ml
<b>Amoxicilina + clavulanato</b>	<b>25,64</b>	<b>29,08</b>
Cefalotina	40,05	27,77
<b>Gentamicina</b>	<b>25,64</b>	<b>21,85</b>
<b>Oxacilina</b>	<b>17,77</b>	<b>19,48</b>
<b>Vancomicina</b>	<b>20,15</b>	<b>23,94</b>

(Fonte: Costa 2021)

Dentre os valores encontrados do antibiograma padrão da *Escherichia coli* ATCC (25922), verificou-se sensibilidade a todos os cinco antibióticos testados.

Em relação aos resultados das médias dos halos de inibição dos antimicrobianos sobre a bactéria *E. coli* tratada com o extrato de *Clitoria fairchildiana*, detectou-se aumento das medidas dos halos de inibição dos seguintes antibióticos: amoxicilina + clavulanato obteve resultados com o observado na gentamicina. Resultado oposto ao imipenem, ciprofloxacino e tetraciclina que não interagiram de forma esperada, ou seja, a aumentar a atividade dos antibióticos quando associados ao extrato de *Clitoria fairchildiana*, mas não a nível de significância estatística, como mostra a tabela 7 abaixo.

Tabela 7: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de *Clitoria fairchildiana*, com a bactéria *Escherichia coli*.

Antibióticos	Médias das [ ] controle	Médias das [ ] C.F 200µg/ml-400µg/ml-800µg/ml
<b>Amoxicilina + clavulanato</b>	<b>24,81</b>	<b>26,82</b>
Ciprofloxacino	34,29	27,23
<b>Gentamicina</b>	<b>20,49</b>	<b>25,44</b>
Imipenem	27,45	25,84
Tetraciclina	28,13	25,26

(Fonte: Costa 2021)

Dos resultados do teste da *E. coli* com o extrato de *Phaseolus vulgaris* observamos que os antibióticos ciprofloxacino e o imipenem demonstraram aumento dos halos, conferindo interação entre eles. Para os outros antibióticos testados como a amoxicilina com clavulanato, gentamicina e tetraciclina houve efeito contrário, com diminuição dos valores de inibição, caracterizando um efeito não sinérgico com o extrato (tabela 8)

Tabela 8: Médias das medidas dos halos (em mm) de inibição dos antibióticos controles com as médias das concentrações do extrato de *Phaseolus vulgaris*, com a bactéria *Escherichia coli*.

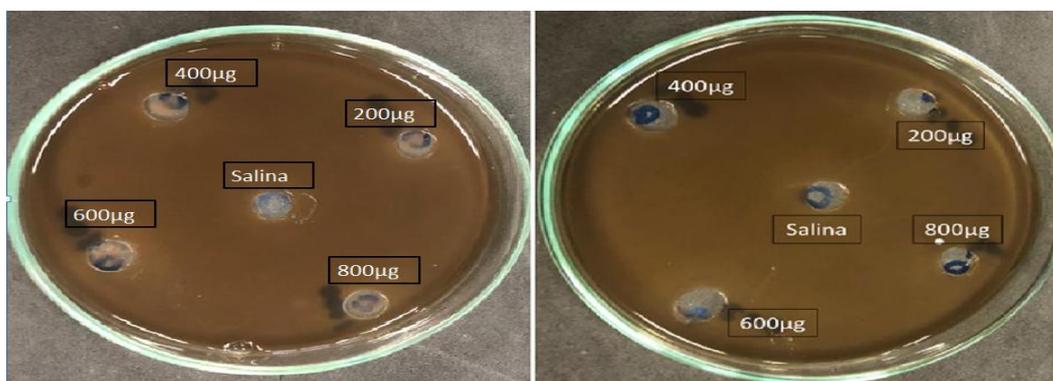
Antibióticos	Médias das [ ] controle	Médias das [ ] P.V 200µg/ml-400µg/ml-800µg/ml
Amoxicilina+ clavulanato	24,81	22,59
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>34,29</b>	<b>37,45</b>
Gentamicina	20,49	19,18
<b>Imipenem</b>	<b>27,45</b>	<b>28,10</b>
Tetraciclina	28,13	26,70

(Fonte: Costa 2021)

### 6.5 Resultado da atividade hemolítica

Para se determinar a provável citotoxicidade dos extratos vegetais foram usadas alíquotas com concentrações distintas dos extratos vegetais da folha de *Phaseolus vulgaris* e da folha de *Clitoria fairchildiana* nas concentrações de 200µg/ml; 400µg/ml; 600µg/ml e 800µg/ml. Que foram depositadas em orifícios de 5mm de diâmetro nas placas contendo ágar sangue de carneiro, incubados por 24 horas a 37°C em estufa para observação de halo de hemólise. Decorrido o período, os extratos não apresentaram halos de hemólise sugerindo que não sejam hemolíticos. Essa avaliação é usada para indicar a citotoxicidade do extrato, sugerindo segurança no uso para futuros testes sobre células.

Figura 10: Teste de hemólise em poço no ágar sangue, de extrato de *Clitoria fairchildiana* (esquerda) e *Phaseolus vulgaris* (direita) em quatro concentrações diferentes.



(Fonte: Costa, 2021)

## 7.0 Discussão

O fenômeno de resistência bacteriana se tornou um problema mundial pela grave ameaça a vida. Se não acontecer o enfrentamento desse processo de forma associada e adequada, o mundo passará para uma era chamada de pós-antibióticos. E como alternativa no auxílio e controle desse processo, é necessário o desenvolvimento de novos compostos, com potenciais efeitos antimicrobianos, (FRACALANZZA e MERQUIOR 2017) é de extrema relevância para o momento que vivemos.

No presente estudo por meio da técnica difusão em microplacas de 96 poços, foi possível observar que o extrato de *Clitoria fairchildiana* apresentou valores de inibição de crescimento bacteriano sobre Gram-positivas, como os *Staphylococcus* e sobre a Gram-negativa *Escherichia coli*. Outros autores relatam inibição com extratos de *Clitoria ternatea* sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Enterococcus faecalis* (SHAHID et al., 2009; MELO et al. 2010). Diferenciando de Malabadi et al. (2012) que não encontrou bons resultados com esses microrganismos com extratos de *Clitoria ternatea*.

A *Clitoria ternatea* é uma espécie pertencente à família das Fabaceas, reconhecida por apresentar ciclopeptídeos de suas raízes, folhas, caules, sementes e flores (NYGUEM et al 2011; POTH et al., 2011a,b) e por fazer parte da lista de vegetais que auxiliam no tratamento de doenças virais (MAITY et al., 2012). Propriedades antifúngicas também são relatadas (KAMILLA et al., 2009; SHAHID et al., 2009; DAS E CHATTERJEE, 2014). E provavelmente a presença desses ciclopeptídeos foram os principais inibidores do crescimento bacteriano neste trabalho.

As características dos *Phaseolus vulgaris* mais relatadas são as ações antifúngicas (CHANG et al. 2013), pelo efeito da faseolina (RAHE et al., 1969). Campos et al. (2019) relatam efeitos do extrato de feijão-jalo sobre fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. Outros resultados com ações antifúngicas utilizando peptídeos vegetais com as espécies de *Phaseolus lunatus* e *Phaseolus vulgaris*, foram eficazes contra os fungos *Oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Botrytis cinerea* (Wong e Ng 2006). Da mesma forma, Games et al. (2008), detectaram um AMP com atividades contra fungos e Tofanelli, (2018) demonstrou atuação de

defensinas extraídas das sementes, capazes de inibir o crescimento de leveduras de importância para a medicina como a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. Guilliermondii*. Wong e Ng (2006) constataram atuação de extratos de *Phaseolus vulgaris* sobre *Mycobacterium phlei*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Proteus vulgaris*. As variações entre as atividades destes peptídeos podem estar relacionadas aos seus mecanismos de ação e estruturação (LEE et al., 2016).

Neste trabalho os resultados dos testes com extratos de folha de *Phaseolus vulgaris* foram possíveis de observar ação antibacteriana sobre a cepa de *E. coli*, com resultados satisfatórios. Franco et al. (2006), isolaram o peptídeo a partir do feijão *Vigna unguiculata* e verificaram ação contra *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas syringae*. Algumas leguminosas possuem peptídeos com ações antimicrobianas e a soja é uma delas, com proteínas de inibição contra bactérias como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans* e *Propionibacterium acnes* (VASCONCELLOS et al. 2014). Almeida et al. (2019) observaram que da mesma família Fabaceae, a espécie *Adenantha pavonina*, possui um peptídeo antimicrobiano com potente ação sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Provavelmente por ser da mesma família, o extrato do *Phaseolus vulgaris* utilizado neste estudo deve possuir as mesmas características para inibir a bactéria. Dessa forma abre caminhos para novas pesquisas sobre essa família de vegetais como potentes alternativas de tratamento de doenças infecciosas importantes.

Com a técnica de interação entre o extrato vegetal de *Clitoria fairchildiana* adicionado ao ágar, suas interações com os antibióticos comerciais sobre ação do *S. aureus* foram observadas. Os antibióticos utilizados (amoxicilina com clavulanato, cefalotina, gentamicina oxacilina e vancomicina) tiveram aumento das medias de seus halos, demonstrando um sinergismo entre eles. O mesmo extrato apresentou interação com os antibióticos ciprofloxacino, gentamicina, imipenem e tetraciclina com bactéria Gram-negativa *E. coli*, apesar de sua dupla camada fosfolipídica (CORDWELL, 2006). Segundo Wagner e Merzenich (2009) para haver

efeitos sinérgicos é necessário a presença de compostos nos constituintes dos extratos que sejam capazes de afetar diferentes alvos ou interagirem de forma a melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de uma ou várias substâncias de um extrato, conforme sugere o observado com o extrato de *Clitoria fairchildiana*.

Com o *Staphylococcus aureus* o sinergismo do extrato da folha de *Phaseolus vulgaris* aconteceu com quatro dos antibióticos (amoxicilina com clavulanato, cefalotina, oxacilina e vancomicina) que tiveram aumento dos halos de inibição, exceto a gentamicina que também não apresentou resultados esperados. Guimarães et al., (2006) relatam que cada antimicrobiano possui características farmacocinéticas bastantes específicas. Segundo Vakulenko e Mobashery (2003) os aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, estreptomicina e tobramicina) possuem a capacidade de desenvolver atividade bactericida sinérgica em associação com outros agentes antimicrobianos, que inibem a biossíntese da parede celular. No presente estudo, com a abordagem utilizada sugere-se que o extrato de *Phaseolus vulgaris* não apresenta moléculas em sua composição, com capacidade de inibição de síntese da parede celular do *S. aureus*. No entanto, houve interação do mesmo extrato com os antibióticos gentamicina, imipenem e tetraciclina sobre ação da Gram-negativa *E. coli*.

Nas avaliações das ações potencialmente efetoras sinérgicas, entre as bactérias *S. aureus* e *E. coli* tratadas com os extratos vegetais de *P. vulgaris* e a *C. fairchildiana* também foi possível verificar interações entre eles e seus antibióticos. Casanova e Costa (2017) concluem que as composições químicas dos extratos vegetais, favorecem a ações sobre vários alvos celulares e moleculares, que acarretam efeitos biológicos mensuráveis, que podem ser observados com outros extratos de plantas ou até mesmo fármacos sintéticos.

Para o *S. aureus* tratado com *P. vulgaris* os antibióticos amoxicilina com clavulanato, vancomicina e oxacilina sofreram interferência benéfica com aumento dos diâmetros de inibição, Dutra et al (2016) em seu trabalho com *S. aureus*, também observou sinergismo entre os extratos de casca de *P. granatum* e folhas de *A. occidentale* com os mesmos antibióticos. Efeito semelhante ao de Fernandes et al. (2012) com extratos de *Psidium*

*guineense* e os antibióticos ampicilina, amoxicilina, cefoxitina, ciprofloxacino e meropenem com *Staphylococcus aureus*, assim como Macedo et al (2012) com extratos de  $\beta$ -Lapachona de *Tabebuia avellanedae*.

Um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos sinérgicos propostos na literatura disponível é a inibição de bombas de efluxo, que permitem o aumento da concentração de extratos no interior das células bacterianas, esse processo pode ter acontecido com os extratos usados nos experimentos anteriores (Casanova e Costa 2017). O que não aconteceu com o trabalho de SILVA et al (2013), com seus extratos de *Cocos nucifera* var. *typica*, que não foram capazes de interagir com os antimicrobianos testados sobre ação do *S. aureus*.

Para o *S. aureus* sobre a ação do extrato de *Clitoria fairchildiana* tiveram seus halos de inibição aumentados. Thongmee e Sukplang (2015), com extratos de *Clitoria ternatea* L. não observaram o mesmo resultado sinérgico com o *S. aureus* analisado, mas com o extrato vegetal de *Citrus hystrix* encontraram inibição. Zawahry et al. (2013), com extrato da fabaceae *Acacia nilótica*, demonstrou melhores resultados sinérgicos com a tetraciclina e norfloxacino para *S. aureus*. Para que efeitos potencializadores entre os compostos dos extratos e os antibióticos aconteçam são necessárias interações farmacocinéticas e ou farmacodinâmicas, pois nem sempre a combinação pode ser benéfica (RIBES ET AL. 200).

Dutra et al (2016) não encontraram alterações com seus extratos com a Gram-negativa *Escherichia coli*, mas esse trabalho encontrou interações com os antibióticos: amoxicilina com clavulanato e gentamicina com o extrato de *Clitoria fairchildiana* e o com *Phaseolus vulgaris* foi possível verificar com o ciprofloxacino e imipenem com ação potencializadora. Calvo et al. (2015) utilizou do extrato de *Kielmeyera coriacea* e obteve sinergismo com os betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbonêmico) macrolídeos e sulfas. Spinella (2002) comenta que muitos mecanismos já foram identificados para essa interação acontecer, mas ainda são insuficientes para explicar os efeitos observados das plantas ou de seus extratos.

Esses efeitos, que podem ser observados com extratos vegetais e fármacos sintéticos, estão ainda em desenvolvimento e o desenvolvimento

de medicamentos mais seguros e eficazes para o tratamento de doenças requer métodos de estudos, purificação e isolamento de substâncias, embora úteis para a obtenção de conhecimentos preliminares, não permitem a caracterização e compreensão de efeitos sinérgicos. Sendo assim, pesquisas de isolamento dos princípios ativos serão necessários para a completa elucidação da atividade antimicrobiana das plantas estudadas no presente trabalho.

## 8.0 Conclusão

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho foi possível concluir que:

- Na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal da folha de *Phaseolus vulgaris*, houve ação antibacteriana sobre a gram negativa *Escherichia coli*, mas sobre ação das gram positivas não foi possível verificar inibição.
- Na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal da folha de *Clitoria fairchildiana* sobre as bactérias gram positiva com melhor ação de inibição sobre a cepa *Staphylococcus aureus* e também um resultado antibacteriano sobre a bactéria gram negativa *Escherichia coli*.
- Na avaliação do sinergismo entre os antimicrobianos comerciais e os extratos de *Phaseolus vulgaris* sobre ação do *S. aureus* e para a *E. coli* observou interação com os antibióticos.
- Na avaliação do sinergismo entre os antimicrobianos comerciais e os extratos de *Clitoria fairchildiana* sobre ação do *S. aureus* e para a *E. coli* observou interação entre os antibióticos.
- Na verificação de interação dos antibióticos comerciais com o *S. aureus* tratado com o extrato vegetal de *Phaseolus vulgaris*, foi possível verificar interações e aumento dos halos de inibição assim como para a *E. coli*
- Na verificação de interação dos antibióticos comerciais com o *S. aureus* tratado com o extrato vegetal de *Clitoria fairchildiana*, foi possível verificar interações e aumento dos halos de inibição dos antibióticos assim como para a *E. coli*

## 9. Referências bibliográficas

AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 6, 733–750, 2008.

ABOYE TL.; STRÖMSTEDT AA.; GUNASEKERA S; BRUHN JG; EL-SEEDI H; ROSENGREN KJ; GÖRANSSON U.: Um peptídeo de nó cistino derivado de toxina derivada de cacto com atividade antimicrobiana seletiva. *Eur J Chem Biol.* 16:1068-1077, 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Memento Fitoterápico: Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2017.

ALMEIDA, M. S. C., MENDONÇA, R. L., FREITAS M. Z. C., E VANDESMET L. C. *Staphylococcus aureus*. Mostra científica em biomedicina, 1 (01), 2016.  
ABRANTES J. A.; Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de *Eugenia florida* DC. Dissertação de mestrado, Rio de Janeiro, 2017.

AICH, N.; AHMED, N.; PAUL, A. Questões de Resistência a Antibióticos na Indústria da Aquicultura e seu caminho a seguir. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 7, 26-41, 2018.

GUILERA, Y.; DUEÑAS, M.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; BENITEZ, V.; ESTEBAN, R.M.; MARTÍN-CABREJAS, M.A. Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of pardina lentil as affected by industrial dehydration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 18, p. 10101-10108. 2010.

ALEGRE, M. L., CHEN, L., DAVID, M. Z., BARTMAN, C., SUSAN B.V., KUMAR, N., CHONG, A. S., & DAUM, R. S.; Impact of *Staphylococcus aureus* USA300 Colonization and Skin Infections on Systemic Immune Responses in Humans. *The Journal of Immunology*, 197(4), 1118-1126, 2016.

ALNAKIP, M.E. et al. Molecular characterisation and typing the methicillin resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from raw milk and cheeses in northwest Spain: A mini survey. *International Dairy Journal*, doi: 10.1016/j.idairyj.2018.09.006; v.89, p.68-76, 2019.

ANVISA. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. v. 9, 2014.

ANNE O. CARTER, M.D., M.H.SC., ALEXANDER A. BORCZYK, M.SC., JACQUELINE A.K. CARLSON, M.B., B.S., BART HARVEY, M.D., M.SC., JAMES C. HOCKIN, M.D., M.A. KARMALI, M.B., CH.B., CHANDRASEKAR KRISHNAN, M.D., DAVID A. KORN, M.D., AND HERMY LIOR, M.SC. N A : Severe Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7–Associated Hemorrhagic Colitis in a Nursing Home. *Engl J Med*; 317:1496-1500, 1987.

APOLINÁRIO , J. M. DOS S. DA S.; Características classificação e patogenicidade do *Staphylococcus aureus*. *Revista Multidisciplinar Em Saúde*, doi.org 10.511612(2), 54, 2021.

BADKE, M.R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Anna Nery*, v.15, n.1, p.132-9, 2011.

BALABAN, N. et al. Auto inducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *S. aureus*. *Science*, v. 280, p. 438-40, 1998.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. *Int J Food Microbiol*, v.61, p.1-10, 2000.

BALUNAS M. J. KINGHORN D.; Descuberta de drogas de plantas medicinales: Revista Ciências da Vida, doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012., v 78; 5, 431-441, 2005.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. Veterinary Dermatology, doi.org/10.1111/j.1365- 3164.2012.01046.x. v.23, p.253- 266, 2012.

BASTOS, R. W. et al. From the environment to the host: How non-azole 29 agrochemical exposure affects the antifungal susceptibility and virulence of 30 *Cryptococcus gattii*. Science of the Total Environment, v. 681, p. 516–523, 2019.

BARRERA-RIVAS C., VALLE-HURTADO N. A., GONZÁLEZ-LUGO G. M., BAIZABAL-AGUIRRE V. M., BRAVO-PATIÑO A., CAJERO-JUÁREZ M. E VALDEZ-ALARCÓN J. J. : DOI: 10.5772/65761, 2017.BECHINGER, B., GORR, S. U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. J. Dent. Res., 96(3), 254-260, 2017.

BEN, Y., FU, C., HU, M., LIU, L., WONG, M. H., ZHENG, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. Environmental research, 2018.

BONILLA-ALDANA, D. K.; DHAMA, K.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Revisiting 35 the One Health Approach in the Context of COVID-19: A Look into the Ecology of this 36 Emerging Disease. Advances in Animal and Veterinary Sciences, v. 8, n. 3, p. 234–37 28,237, 2020.

BURMAN, R. et al. Distribution of circular proteins in plants: Large-scale mapping 11 of cyclotides in the Violaceae. Frontiers in Plant Science, v. 6, n. October, 2015.

BHATTACHARJYA S, RAMAMOORTHY A. Peptídeos multifuncionais de defesa hospedeiro: insights funcionais e mecanicistas das estruturas NMR de potentes peptídeos antimicrobianos. *FEBS J.* doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07357.x.; 276: 6465-6473, 2009.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to 5 agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. *Science of the Total Environment*, v. 650, p. 1231–1238, 7 2019.

BROGDEN, K. A.; Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(3), 238-250,2005.

CABELLO, F.C.; GODFREY, H.P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DÖLZ, H.; MILLANAO, A.; BUSCHMANN, A.H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.*, 15, 1917–1942, 2013.

CALVO T. L., SOUZA P. F., BARBOSA L. S., SEVERINO V. G. P. , FERREIRA A. L.-: Estudo in vitro da atividade antimicrobiana e sinergismo de extrato de *K. coriacea* (CLUSIACEAE) e antimicrobianos para *E. Coli* . ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22 Ed. Esp.; p. 2015.

CAMPOS, M. L. et al. A structural perspective of plant antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*, v. 475, n. 21, p. 3359–3375, 2018b.

CAMPOS L. S. , PEREIRA D. J. , COELHO S. P. A. , PAIXÃO D. C., ANJOS L. M.; Atividade antifúngica de tanino em sementes de feijão-jalo; Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC Palmas/TO – Brasil, 2019.

CAMARERO e CAMPBELL. The Potential of the Cyclotide Scaffold for Drug Development. *Biomedicines*, v. 7, n. 2, p. 31, 19 abr. 2019.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S.S.; Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. Revista. Virtual Química. 9 (2), 575-595, 2017.

CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. J Pediatr, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CARVALHO RH, GONTIJO FILHO PP. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. Braz. J. Microbiol; 39 (4): 623-30, 2008.

CASSETTARI V.C.,STRABELLI T., MEDEIROS E.A.S.; Staphylococcus aureus Bacteremia: What is the Impact of Oxacillin Resistance on Mortality?; The Brazilian Journal of Infectious Diseases;9(1):70-76, 2005.

CAVALCANTI, S. et al. Prevalence of Staphylococcus aureus introduced into intensive care units of a university hospital. Braz J Infect Dis, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CORSINI, V.O. SILVA, O.V. CARVALHO, R.V. SEPÚLVEDA, F.L. VALENTE, E.C.C. REIS, M.A.S. MOREIRA, A. SILVA JÚNIOR, A.P.B. BORGES. Emergence of multidrug-resistant bacteria isolated from surgical site infection in dogs and; Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.4, p.1213-1220, 2020.

CONCEIÇÃO, ROGÉRIO ARCURI. Formação de biofilme em amostras de Escherichia coli associada a sepse (SEPEC) = caracterização fenotípica, genotípica e filogenia. 66f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. 2010.

CORDWELL, S. J. Technologies for bacterial surface proteomics. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 9, n. 3, p. 320–9, 2006.

COSTA, C. N. Estimativa de parâmetros genéticos, fenotípicos e ambientes para as produções de leite no dia do controle e em 305 dias de lactação de vacas da raça Gir. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 5, p. 1953-1963, 2002.

COSTA, E. M. M. DE B. et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 3, p. 175–180, 2010.

COSTA G. L. et al. Morfologia de frutos, sementes e plântulas, e anatomia das sementes de sombreiro (*Clitoria fairchildiana*). *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 57, n. 4, p. 414–421, 2014.

COSTA, L. G. Germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Clitoria fairchildiana* Howard, 24 f. Monografia (Graduação em curso de Engenheiro Florestal) - Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2011.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *May 21;284 (5418):1318-22*, 1999.

CUNY C, FRIEDRICH A, KOZYTSKA S, LAYER F, NUBEL U, OHLSEN K, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) indifferent animal species. *Int J Med Microbiol.*; 300 (2-3):109-17, 2010.

CHANG RL, CHO IH, JEONG BC, LEE SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int. J. Environ. Res Public Health*; 10 (9): 4274-305, 2013.

CHILDERS, B. M. et al. MrkD1p from *Klebsiella pneumoniae* Strain IA565 Allows for Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* and Protection from

Pretease-Mediated Biofilm Detachment. *Infection and Immunology*, Bethesda, v. 81, n. 11, p. 4112-4120, 2013.

CHEN L, ZHANG Q, YUAN X, CAO Y, YUAN Y, YIN H, DING X, ZHU Z, LUO SZ. Como a distribuição de carga influencia a função de peptídeos ativos em membrana: lítico ou penetrante celular? *Int J Biochem Cell Biol.*; doi: 10.1016/j.biocel.2016.12.011; v83: 71-75, 2017.

CRAIK, D. J. Host-defense activities of cyclotides. *Toxins*, v. 4, n. 2, p. 139–156, 37 29, 2012.

CRETENET M., EVEN S. & LE LOIR Y.; Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. Technol.* 91:127-150, 2011.

DANTZGER, M. et al. Bowman – Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds : Isolation , biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry*, v. 118, p. 224–235, 2015.

DE BOER E, ZWARTKRUIS-NAHUIS JTM, WIT B, HUIJSDENS XW, NEELING AJ, BOSCH T, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol.*;134(1-2):52-6, 2009.

DEBOUCK, D. Systematics and morphology. In: VAN CHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. Common beans: research for crop improvement. Cali: CAB: International, p. 55-118, 1993.

DONLAN, R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Infectious Diseases Society of America*, Chicago, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DORVINCILA R, SOTOMAYOR-RAMÍREZ D, BEAVERB J: Performance agrônômica das linhas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em um Oxisol. *Field Crops Res.* 10.1016/j.fcr.2010.06.003, 118: 264-272, 2010.

DUTRA F. S. G.; CARLOS A. L ; MOTTA V. O.; VIANNA P.A.; PEREIRA S. M.F.; ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE À BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA. Revista perspectiva online biologia e saúde, V 20, (6)1-3, 2016.

DUCKE, A.; BLACK, G. A. Notas sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira. Boletim Técnico Instituto Agrônômico Norte, v.29, p.1-69, 1953.

ECDC/EFSA/EMA; second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. EFSA J, 15,2017.

EBRAHIM S., USHA K., SINGH B. Pathogenesis related (pr) proteins in plant defense mechanism. *Sci. Against Microb. Pathog.* ;2:1043–1054, 2011.

ELOFF J. N. Um método de microplacção sensível e rápido para determinar a concentração inibitória mínima de extratos vegetais para bactérias. *Planta Med.* doi: 10.1055/s-2006-957563. 9933989. Dez;64(8):711-3,1998.

ESSACK SY, SARTORIUS B. Global antibiotic resistance: Of contagion, confounders, and the com-b model. *Lancet Planet Health*; doi: [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30187-6](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30187-6); 2(9):e376-e7, 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 2015.

FAIR, R. J. E TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Medicin. Chem.* 6, 25–64. doi:10.4137/PMC.S14459.Received. 2014.

FEITOSA, C.M. et al. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biologi*, v.71, n.3, p.783-9, 2011.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance : Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

FENSTERSEIFER, I. C. M. et al. Effects of cyclotides against cutaneous infections 23 caused by *Staphylococcus aureus*. *Peptides*, v. 63, p. 38–42, 2015.

FIGUEIREDO MENDES, C. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 23, n. 7, p. 402-5, 2005.

FOX, J.L. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat. Biotechnol.* 31, 379–382, doi.org/10.1038/nbt.2572, 2013.

FORZZA, R.C. et al. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010

FRANCO OL, MURAD AM, LEITE JR, MENDES PA, PRATES MV, BLOCH C JR. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. *Febs J. Aug*; 273(15): 3489-97, 2006.

FRACALANZZA S. E. L.; MERQUIOR V. L. C., *Revista Brasileira de microbiologia*, Ano 8, nº 31, 2017.

FREIRE N. B., PIRES L. C.S.R., OLIVEIRA H. P., COSTA M. M.: Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. *Pesq. Vet. Bras.* 38(2):244-249, DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-4805, 2018.

GUAJARÁ, M.; CARVALHO, A. G.; SANTOS, W.; GONÇALVES, K. Aspectos da biologia de *Euphalerus clitoriae* Burckhardt & Guajará, 2000 (Hemiptera: Psyllidae) sob condições de campo. *Floresta e Ambiente*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 69-75, 2003

GUIMARÃES C. D. DE O.; FERREIRA C. DA S.; DA SILVA K. M. C.; VIEIRA A. B. R.; VIEIRA J. M. DOS S.; Isolamento bacteriano e suscetibilidade microbiana em amostras biológicas de cães, - PUBVET v.11, n.2, p.168-175, Fev., 2017.

GUIMARÃES, S. ET AL.:Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas. Porto: Porto Editora. 2006.

GUPTA, J. K. CHAHAL, J. BHATIA, M. Clitoria ternatea (L.): Old and new aspects. Journal of Pharmacy Research, Índia, v. 11, n. 03, p.2610-2614, 2010.

GLASER CA,ANGULO FJ, ROONEY JA. Infecções oportunistas associadas a animais entre pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.*Clin Infect Dis* ) 18:14-24. doi:10.1093/clinids/18.1.14,1994.

GOGUEN, J.D.; HOLE, N.P.; Subrahmanyam, Y.V. Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. Infect. Agents Dis., 4, 47-54, 1995.

GONZALES E. ;MELLO H. H. DE C. ; CAFÉ M. B.; Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal Revista UFG; Ano XIII nº 13; Dezembro, 2012.

GAMES, P. D., SANTOS, I. S., MELLO, E. O., DIZ, M. S. S., CARVALHO, A. O., SOUZA-FILHO, G. A., DA CUNHA, M., VASCONCELOS, I. M., FERREIRA, B. S., GOMES, V. M.; Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from Phaseolus vulgaris L. seeds. Peptides, 29:2090-2100. 2008.

HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. Nature Reviews: Microbiology, Londres, v. 2, n.2, p. 95-108, 2004.

HELMSTÄDTER A. BEANS AND DIABETES: *Phaseolus vulgaris* Preparations as Antihyperglycemic Agents. *J Med Food.*; 13(2):251-254. doi:10.1089/jmf.2009.0002, 2010.

HENRIQUES, S. T.; HUANG, Y. H.; CASTANHO, M. A.; BAGATOLLI, L. A.; SONZA, S.; TACHEDJIAN, G.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Phosphatidylethanolamine binding is a conserved feature of cyclotide-membrane interactions. *The Journal of biological chemistry*, v. 287, n. 40, p. 33629-43, 2012a.

HILCHIE AL, WUERTH K, HANCOCK RE. Modulação imunológica por peptídeos de defesa de hospedeiro cationic multifacetados (antimicrobianos). *Nat Chem Biol.*; 9:761-768. doi: 10.1038/nchembio.1393., 2013.

HOLMES, A.H.; MOORE, L.S.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P.J.; PIDDOCK, L.J. Entendendo os mecanismos e os condutores da resistência antimicrobiana. *Lancet*, 387, 176-187, 2016.

HO, J.; BOOST, M.; O'DONOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. *Epidemiology and Infection*, v.143, n.8, p.1751-1760, 2015.

HNILICA K.A., *Small Animal Dermatology: a color atlas and therapeutic guide*. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 640p, 2011.

ISHAQ, N.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Medicinal potentialities of plant defensins: a review with applied perspectives. *Medicines*, v. 6, n. 1, 2019.

KAMILLA L, MANSOR SM, RAMANATHAN S, SASIDHARAN S, Effects of *Clitoria ternatea* leaf extract on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microsci. Microanal.*, 15: 366-372, 2009.

KARPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. T. ; Pathogenic Escherichia coli. *Nature Microbiology Reviews*, 2, 123-140, 2004.

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de Biofilme na Indústria de Alimentos e Métodos de Validação de Superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, São Paulo, n.15, 2010.

KERENGA BK, MCKENNA JA, HARVEY PJ, QUIMBAR P, GARCIA-CERON D, LAY FT, PHAN TK, VENEER PK, VASA S, PARISI K, SHAFEE TMA, van der Weerden NL, Hulett MD, Craik DJ, Anderson MA, Bleackley MR. Salt tolerante atividades antifúngicas e antibacterianas do defensin de milho ZmD32. ; 10:795. doi: 10.3389/fmicb.2019.00795, 2019.

KONEMAN, E.W., et al. *Diagnóstico Microbiológico*. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., p. 466, 2001.

KHALID, M. et al. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. *Journal Of Integrative Agriculture*, v. 18, n. 1, p. 211-230, 2019.

KUMAR P, KIZHAKKEDATHU JN, STRAUS SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1), pii: E4, 2018.

LAMBRECHTS, A.A.; HUMAN, I.S.; DOUGHARI, J.H.; LUES, J.F.R. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries in South Africa. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v.30, n.4, p.755-758, 2014.

LEWIES A, WENTZEL JF, JACOBS G, DU PLESSIS LH. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. *Molecules*; 20(8), 15392-15433, 2015.

LEE, T. H.; HALL, K. N.; AGUILAR, M. I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr Top Med Chem*, v. 16, n. 1, p. 25-39, 2016.

LIMA C. C., BENJAMIM S. C. C., SANTOS R. F. S.; Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão.; 6 jan.-jun.; 11(1): 105-113, 2017.

LIMA, D. C. et al. Snake venom: any clue for antibiotics and cam, *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. n. 55, p. 1084-96, 2008.

LOPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 7, p. a000398–a000398, 1 jul. 2010.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 384 p. (v. 1), 2008.

MA, X. X. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 4, p. 1147–52, 1 abr. 2002.

MACEDO ET AL.; Efeito sinérgico entre a  $\beta$ -lapachona e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Dissertação de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Produtos Naturais e Bioativos. Recife, 2012

MALAGÓN, D. et al. Anthelmintic activity of the cyclotides (kalata b1 and b2) 8 against schistosome parasites. *Biopolymers*, v. 100, n. 5, p. 461–470, 2013.

MAITY, N.; et al. Standardized Clitoria ternatea leaf extract as hyaluronidase, elastase and matrixmetalloproteinase-1 inhibitor. Indian J Pharmacol, v. 44, n. 5, p. 584-587, 2012.

MAGILL SS, O'LEARY E, JANELLE SJ, ET AL.; Emerging Infections Program Hospital Prevalence Survey Team. Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. hospitals. N Engl J Med doi.org/10.1056/NEJMoa1801550379: 1732–44, 2018.

MARSTON, H.D.; DIXON, D.M. KNISELY, J.M.; PALMORE, T.N.; FAUCI, resistência antimicrobiana. JAMA, 316, 1193-1204, 2016.

MEHTA P; MCAULEY D. F .; BROWN M.; SANCHEZ E.; TATTERSALL R. S.; MANSON J. J.; COVID-19: considere síndromes da tempestade de citocinas e imunossupressão; doi.org/10.1016/ S0140-6736(20)30630-9, Vol 395 March 28, 2020.

MILLER, W H; GRIFFIN, C E; CAMPBELL, K L. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. Elsevier, 7ed. p. 184-223, 2013.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with environment. Molecules, 19, p. 16240-16265, ISSN 1420-3049, 2014.

MELO M. S.; SANTOS M. C.; COSTA J. G. ; PIRES L. L. S.; ROCHA T. J. M. ; SANTOS A. F., Phytochemical characterization of Clitoria ternatea Linn biodirected for its potential against multiresistant microorganisms. Diversitas Journal ISSN 2525-5215, Volume 3, Número 2 , pp: 429-441, 2018.

MONTOYA CA, LALLÉS J-P, BEEBE S, MONTAGNE L, SOUFFRANT WB, LETERME P. Influence of the Phaseolus vulgaris phaseolin level of incorporation, type and thermal treatment on gut characteristics in rats . Br J Nutr.; 95(1):116-123. doi:10.1079/bjn20051613, 2006.

MORAES, N. B. et al. A evolução da saúde pública veterinária no Brasil: do controle da raiva à saúde única. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária* 2020.

MOLINA-LOPEZ R.A., VALVERDÚ N., MARTIN M., MATEU E., OBON E., CERDÀ-CUÉLLAR M. & DARWICH L.. Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. *Vet Rec*, 168, 565b-567b, 2011.

MULDER, N.-D. *Global protein market outlook* , 2019.

MUHAMMAD E., R.; RABETA, M.S. A: Potential of Telang tree (*Clitoria ternatea*) in human health *Food Research*; doi.org/10.26656/fr.2017.2(5).073, 2 (5) : 415 – 420, 2018.

MUKHERJEE PK, WIEST A, RUIZ N, KEIGHTLEY A, MORAN-DIEZ ME, MCCLUSKEY K, POUCHUS YF, KENERLEY; Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *CMJ Biol Chem*. Feb 11; 286(6):4544-54,2011.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. L. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 108-113. 2007.

NGUYEN-VIET, H. et al. Reduction of antimicrobial use and resistance needs 29 sectoral-collaborations with a One Health approach: perspectives from Asia. *30 International Journal of Public Health*, v. 62, p. 3–5, 2017.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, v. 29, n. 9, p. 464–72, 2011.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem*, v. 269, n. 6, p. 3905-8, 1994.

NICASTRO, G. G; BOECHAT, A. L; ABE, C. M; KAIHAMI, G. H; BALDINI, R. L. PA cupD transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiology Letters*, 301:115-123, 2009.

NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American journal of infection control*, v. 32, n. 8, p. 470–85, 1 dez. 2004.

NOBRE, C. P.; FERRAZ JÚNIOR, A. S. L.; GOTO, B. T.; BERBARA, R. L. L.; NOGUEIRA, M. D. C. Fungos micorrízicos arbusculares em sistema de aléias no Estado do Maranhão, Brasil. *Acta Amazonica*, doi.org/10.1590/S0044-59672010000400002, v. 40, n. 4, p. 641-646, 2010.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A.L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA in foods of animal origin product in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 219–222, 2007.

OMS. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. Organización Mundial de la Salud. 2015.

OMS - World Health Organization. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de ação. 2012.

OLIVEIRA, L. O. et al. A Trypsin inhibitor from *Clitoria fairchildiana* cotyledons is active against digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Protein & Peptide Letters*, v. 22, n. 10, p. 893–902, 2015.

OLIVARES, J.; BERNARDINI, A.; GARCIA-LEON, G.; CORONA, F.; SANCHEZ, M.B. Martinez O resistome intrínseco de patógenos bacterianos. *Na frente. Microbiol.* v 4, 103, 2013.

OMARDIEN S, BRUL S, ZAAT S TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3a Ed. São Paulo: Atheneu, 586p, 1999.

OJEDA, P. G.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Pharmaceutical applications of 34 cyclotides. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 11, p. 2152–2161, 2019.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*—The “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7, 555–567, 2009.

PALMA E., TILOCCA B. AND P. RONCADA; *International Journal of Molecular Sciences Review Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview* \* *Int. J. Mol.*, 21, 1914; doi:10.3390/ijms21061914; Sci. 2020.

PAIM R.S.P., LORENZINI E.: Incidência bacteriana e resistência antimicrobiana de uma instituição hospitalar de médio porte da região nordeste do Rio Grande do Sul. *Biblioteca Lascasas*; 9 (3), 2014.

PARSEK M. R., GREENBERG E.P., *Sociomicrobiology: as conexões entre sensoriamento de quórum e biofilmes*. *Tendências Microbiol.* doi: 10.1016/j.tim.2004.11.007. 15639629, Jan;13(1):27-33., 2005.

PELLEGRINO, F. L. *et al* Occurrence of a multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 2420-4, 2002.

PENNA, BRUNO ; SILVA, MARCELLA B. ; SOARES, ANDRÉ E. R. ; VASCONCELOS, ANA T. R. ; RAMUNDO, MARIANA S. ; FERREIRA, FABIENNE A. ; SILVA-CARVALHO, MARIA C. ; DE SOUSA, VIVIANE S. ; RABELLO, RENATA F. ; BANDEIRA, PAULA T. ; DE SOUZA, VIVIANE S. ;

PLANET, PAUL J. ; Vieira-da-Motta, Olney ; BOTELHO, ANA M. N. ; FIGUEIREDO, AGNES M. S. . Comparative genomics of MRSA strains from human and canine origins reveals similar virulence gene repertoire. *Scientific Reports*, v. 11, p. 4724, 2021.

POMBA, C.; RANTALA M.; GREKO C.; BAPTISTE K. E. ; CATRY B.; DUIJKEREN E. ; MATEUS A.; MORENO M. A. ; PYORALA S.; ZAUSKAS M. RU; SANDERS P.; TEALE C.; THRELFALL E. J.; KUNSAGI Z.; TORREN-E. J. ; JUKES H. E TORNEKE, K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother*; doi:10.1093/jac/dkw481, 72: 957–968, 2017.

PINTO, A.; Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Millenium*, (v) 4:91- 100,1996.

POTH, A. G. et al. Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins 21 in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 22 of America*, v. 108, n. 25, p. 10127–10132, 2011.

POTH, A. G., COLGRAVE, M. L., LYONS, R. E., DALY, N. L., E CRAIK, D. J. Descoberta de uma origem biossintética incomum para proteínas circulares em leguminosas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10127–10132. doi: 10.1073/pnas.1103660108, 2011a.

POTH, A. G., COLGRAVE, M. L., PHILIP, R., KERENGA, B., DALY, N. L., ANDERSON, M. A., et al.; A descoberta de ciclotídeos na família vegetal fabaceae fornece novas percepções sobre a ciclização, evolução e distribuição de proteínas circulares. *ACS Chem. Biol.* 6, 345–355. doi: 10.1021/cb100388j, 2011b.

PORTO, W. F. et al. In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables 19 combinatorial exploration for peptide design. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, 2018.

PLAN, M. R. R. et al. Backbone cyclised peptides from plants show molluscicidal activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 13, p. 5237–5241, 2008.

PRABHU S, DENNISON SR, MURA M, LEA RW, SNAPE TJ, HARRIS F. Cn-AMP2 da água de coco verde é um peptídeo anticâncer aniônico. *Pept Sci.* ; 20:909-915. doi: 10.1002/psc.2684, 2014.

PRÄNTING M, LÖÖV C, BURMAN R, GÖRANSSON U, ANDERSSON DI. A cicloicida cicloviolacina O2 de *Viola odorata* tem potente atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas. *J Antimicrob Chemother.*; 65:1964-1971. doi: 10.1093/jac/dkq220, 2010.

QIAN, Z.; DOUGHERTY, P. G.; PEI, D. Targeting intracellular protein–protein interactions with cell-permeable cyclic peptides. *Current Opinion in Chemical Biology*, 28 v. 38, p. 80–86, 2017.

RASCALOU G, PONTIER D, MENU F, GOURBIÈRE S. Emergência e prevalência de doenças transmitidas por vetores humanos em populações de vetores de sumidouros. *PLoSOne* 7(5):e36858. doi:10.1371/journal.pone.0036858, 2011.

RAGHUNATH D. Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India. *J Biosci*;33(4):593-603, 2008.

RANDO JG, SOUZA VC. Clitoria; in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

RAHE, J.E.; KUC, J.; CHUANG, C.M.; WILLIAMS, E.B. Induced resistance in *Phaseolus vulgaris* to bean anthracnose. *Phytopathology*, v. 59, p.1641-1645, 1969.

RICE LB, SAHM D, BINOMO RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. Washington: ASM Press; p. 1074-101, 2003.

REIS A.L., MONTANHINI M., BITTENCOURT J.V., DESTRO M.T. & BERSOT L.S.. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. Braz. J. Microbiol. 44:1195-1198, 2013.

RENTAS 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre, (2014)..

ROZEN, R; BACHARACH, G; BRONSHTEYN, M; STEINBERG, D.; The role of Fructans on Dental Biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. FEMS. Microbiology Letters, v195, p 205-210, 2001.

RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, C. L., BAKER, D. J. Clin Microbiol Rev.13, 301, 2000.

ROWAN, A. KARTAL, T. Dog population e dog abrigando tendências nos Estados Unidos da América. *Animais*, 8, 68, 2018.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 2, n. 11, p. a012427–a012427, 1 nov, 2012.

RYU, S.H.; PARK, S.G.; CHOI, S.M.; HWANG, Y.O.; HAM, H.J.; KIM, S.U.; LEE, Y.K.; KIM, M.S.; PARK, G.Y.; KIM, K.S.; et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. Int. J. Food Microbiol. 152, 14–18,2012.

SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da Demanda Mundial de 33 Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. Revista de Economia e Sociologia 34 Rural, v. 56, n. 2, p. 195–212, 2018.

SANGPHUKIEO A, NAWAE W, LAOMETTACHIT T, SUPASITTHIMETHEE U, RUENGJITCHATCHAWALYA M.; Computational Design of Hypothetical New Peptides Based on a Cyclotide Scaffold as HIV gp120 Inhibitor. PLoS ONE 10(10): e0139562. doi:10.1371/journal.pone.0139562,2015.

SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. Int. J. Antimicrob. Agents, 52, 135–143, 2018.

SANTOS RAF, DAVID JM, DAVID JP. Detection and quantification of rotenoids from *Clitoria fairchildiana* and its lipids profile. Nat Prod Commun.; 11 (5): 631-633. ISSN: 1934-578X, 2016.

SANTOS J. R.; MEZA S. K. L.; MARTINI K. C.; NUNES R. V.; A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte; Scientia Agraria Paranaensis, Mal. Cdo. Rondon, v. 12, n. 3, jul./set., p.167-174, 2013.

SANTOS, J. B. dos; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C., JÚNIOR, J. de P., BORÉM, A (eds.). Feijão. Editora UFV. 2ª Edição atualizada. p. 41-65. Viçosa-MG. 2006

SANTURIO J. M.; SANTURIO D. F.; POZZATTI P.; MORAES C.; FRANCHIN P. R.; ALVES. H.; Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enterica* serovars from avian source. Revista Ciência Rural, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, mai-jun doi.org/10.1590/S0103-84782007000300031. 2007.

SELS J, MATHYS J, DE CONINCK BM, CAMMUE BP, DE BOLLE MF; Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides; Plant Physiol Biochem Nov; 46(11):941-50, 2008.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY M. K. ; GROSSART H.P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature Saswati ; published: 12 March, doi: 10.3389/fmicb.2013.00047, 2013.

SILVA M. S.; RIBEIRO, SUZANNA F. F. ; TAVEIRA GB ; RODRIGUES, Rosana ; FERNANDES, Katia V S ; CARVALHO, A. O. ; VASCONCELOS, Ilka Maria ; Mello, Érica O. ; GOMES, V. M. . Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from *Capsicum annum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 1, p. 1-1, 2017.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Antiinflammatory Activity of Rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. *Phytochemistry Res.*, v. 16, p. S87-S88, 2002.

SILVA, B. M. S.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - FABACEAE). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 30, p. 195-201, 2008.

SILVA, H. T. da. Análise da divergência genética do germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) melhorado e tradicional (Crioulo) cultivado no Brasil, e das formas silvestres de origem Centro e Sul Americana. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

SILVA DOM,G.R.; DASILVA,A.J.R.;ALVIANO.D.S.; NASCIMENTOS,R.O.; KAPLAN,M.A.C.; ALVIANO,C.S.; Chemical and antimicrobial analysis of husk fiber aqueous extract from *Cocos nucifera* L. *African Journal of Biotechnology* (18)12, 2013.

SILVA, M. S. et al. Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor 8 from *Capsicum annum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and 9 intracellular target in phytopathogenic fungi cells. *Journal of the Science of Food and 10 Agriculture*, v. 97, n. 11, p. 3790–3801, 2017.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quimica Nova*, v. 29, n. 4, p. 844–855, 2006.

SINHA M, SINGH RP, KUSHWAHA GS, IQBAL N, SINGH A, KAUSHIK S, KAUR P, SHARMA S, SINGH TP, Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families; *Scientific World Journal*.;543195, 2014.

SCOCCHI, M. et al. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 16, n. 1, p. 76–88, 2016.

SCHAUSS K, FOCKS A, HEUER H, KOTZERKE A, SCHMITT H, THIELEBRUHN S, et al. Análise, destino e efeitos do antibiótico sulfadiazina nos ecossistemas do solo. *Trac-Trends Anal Chem*, doi:10.1016/j.trac.2009.02.009, 28:612-8., 2009.

SHYAMKUMAR, ISHWAR B. Anti-inflammatory, analgesic, and phytochemical studies of *Clitoria ternatea* Linn flower extract. *Int Res J Pharm.*; 3 (3): 208-210. ISSN: 2230-8407, 2012.

STOODLEY, P., SAUER, K. , DAVIES D.G., COSTERTON, E.J.W.: Biofilmes como comunidades diferenciadas complexas. [doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705), vol. 56:187-209, 2002.

SHAHID M, SHAHID A, ANIS M,. Antibacterial potential of the extracts derived from leaves of medicinal plants *Pterocarpus marsupium* Roxb., *Clitoria ternatea*. *Orient. Pharm. Exp. Med.*, 9: 174-181,2009.

SLAZAK, B. et al. How does the sweet violet (*Viola odorata* L.) fight pathogens and 15 pests – cyclotides as a comprehensive plant host defense system. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. September, 2018.

SPINELLA M. , EATON L.A.; *Brain. Inj.* 16: 359-67, 2002.

STINTZI A, HEITZ T, PRASAD V, WIEDEMANN-MERDINOGLU S, KAUFFMANN S, GEOFFROY P, LEGRAND M, FRITIG B *BIOCHIMIE.*; Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens.; 75(8):687-706, 1993.

STEFANELLO, M.E.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.4, p.525-30, 2006.

TANG, S S.; APISARNTHANARAK, A.; HSUC, L Y. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv. Drug Deliv Rev.*, v. 78, p. 3 - 13, 2014.

TAM, J.P., WANG, S., WONG, K.H. AND TAN, W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals* 8, 711–757; doi.org/10.3390/ ph804071, 2015.

TAYLOR LH, LATHAM SM, Woolhouse MEJ. Fatores de risco para o surgimento de doenças humanas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* . doi: 10.1098/rstb.2001.0888, 356(1411):983-9, 2001.

TAUXE RV. Doenças emergentes transmitidas por alimentos: um desafio de saúde pública em evolução. doi:10.3201/eid0304.970403, *Emerg Infect Dis*, 3(4):425-34. 1997.

TOFANELLI E. J.; Atividade antimicrobiana da defensina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PvD1) em combinação com fluconazol sobre as leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans*: Dissertação para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, 2018.

TRABULSI, Luiz Rachid. Bactérias de interesse médico. In: *Microbiologia*[S.l: s.n.], 1999.

TRENTIN, D. D. S. DA S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 113–238, 2013.

THONGMEE A.; SUKPLANG P.; Synergism between natural product extracts and antibiotics against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Rangsit Journal of Arts and Sciences*; ISSN 2392-554X (Online); Vol. 5 No. 1, pp. 19-25, 2015.

TYLOVA, T., OLISOVSKA, J., NOVAK, P., FLIEGER, M., High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere* 78, 353– 359, 2010.

VASCONCELLOS FCS, WOICIECHOWSKI AL, SOCCOL VT, MANTOVANI D, SOCCOL CR. Antimicrobial and antioxidant properties of  $\beta$ -conglycinin and glycinin from soy protein isolate. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* Abr; 3(8) 144-157, 2014.

VALE N, AGUIAR L, GOMES P. Antimicrobial peptides: A new class of antimalarial drugs?. *Front. Pharmacol.*, V 5, 275, 2014.

VAKULENKO, S. E MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, pp. 430-450 2003.

VEIGA JR, V. F., PINTO A. C.; PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? ; *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VIEIRA, V. A Ameaça Das Super Bactérias. *Informativo sbm*, v. 8, 2017.

ZAMBORI C, CUMPANASOIU C, MLADIN B, TIRZIU E. Biofilmes na cavidade oral de cães e implicação em infecções zoonóticas. *Anim Sci Biotechnol*, 46(1), 2013.

ZAKARIA, N. N. A., OKELLO, E. J., HOWES, M. J., BIRCH-MACHIN, M. A., & BOWMAN, A. In vitro protective effects of an aqueous extract of *Clitoria ternatea* L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes. *Phytotherapy Research*, 32(6), 1064–1072. doi.org/10.1002/ptr.6045, 2018.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1117, n. January, p. 3–6, 2019.

WALTNER-TOEWS, D. Zoonoses, one health and complexity: Wicked problems and constructive conflict. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: 9 Biological Sciences*, v. 372, n. 1725, 2017.

WANG, G. Database Resources Dedicated to Antimicrobial Peptides. In: 16 *Antimicrobial Resistance and Food Safety: Methods and Techniques*. [s.l: s.n.]. p. 17 365–384. 2015.

WANG S, ZENG X, YANG Q, QIAO S. Peptídeos antimicrobianos como potenciais alternativas aos antibióticos na indústria animal alimentícia. *Int J Mol Sci* ; 17:603. doi: 10.3390/ijms17050603, 2016.

WAGNER H.; ULRICH-MERZENICH G.: Pesquisa de sinergia: Aproximando-se de uma nova geração de fitofarmacêuticos., *Phytomedicine* 16(2-3), 97-110. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.018, 2009.

WALSH TR. A one-health approach to antimicrobial resistance. *Nat Microbiol.*; doi.org/10.1038/ s41564-018-0208-5, v3(8):854-5, 2018.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.418- 429, 2010.

WELBURN, S. C. et al. The neglected zoonoses-the case for integrated control and advocacy. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 21, n. 5, p. 433–443, 2015.

WOOD, C. L. et al. Does biodiversity protect humans against infectious disease? *Ecology*, v. 95, n. 4, p. 817–832, 2014.

WONG JH, NG TB. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). *Peptides*. Nov; 26(11):2086-92, 2006.

YUSSEF, M; SHURMAN, A; BOUGNOUX, M. E.; RAWASHEDED, M; BREATAGNE, S; STROCKBINE, N. Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan. *FEMS Immunology Medical and Microbiology*, 28:257-263, 2000.

YOUNG R., SIMPSON K. Scientists Try To Pinpoint Animal Origins Of COVID-19, February 13, 2020. Disponível em: <https://www.wbur.org/hereandnow/2020/02/13/new-coronavirus-originsdeaths>.