

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA DO LÍQUEN
Cladonia verticillaris (CLAVELL) SOBRE BACTÉRIAS E
FUNGOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

DALILA DE BRITO MARQUES RAMOS

**ORIENTADORA: Prof^a. Dra. LUANA CASSANDRA BREITENBACH B.
COELHO**

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

RECIFE

2011

DALILA DE BRITO MARQUES RAMOS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA DO LÍQUEN *Cladonia
verticillaris* (CLAVELL) SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA

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

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. LUANA CASSANDRA BREITENBACH B. COELHO,

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA.

RECIFE

2011

Ramos, Dalila de Brito Marques

Atividade antimicrobiana da lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (CLAVELL) sobre bactérias e fungos de importância médica/ Dalila de Brito Marques Ramos. – Recife: O Autor, 2011.

46 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach B. Coelho

Co-orientadora: Michele Dalvina Correia da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2011

Inclui bibliografia

1. Lectinas 2. Líquens 3. Bactérias I. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-208

Dalila de Brito Marques Ramos

"Atividade antimicrobiana da lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (ClavelL)
sobre bactérias e fungos de importância médica"

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

Aprovado por:

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Presidente

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Profa. Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho

Data: 22 / 02 / 2011

À minha mãe, pelo seu imenso amor e incentivo.

*"Tudo o que acontece no universo
tem uma razão de ser; um objetivo.
Nós como seres humanos, temos
uma só lição na vida: seguir em frente
e ter a certeza de que apesar de
às vezes estar no escuro,
o sol vai voltar a brilhar"*

(Irmã Dulce Maria)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Lectinas	1
1.1.1 Histórico e conceito	1
1.1.2 Detecção	2
1.1.3 Purificação	3
1.1.4 Ocorrência das lectinas	4
1.2 Aplicações biotecnológicas das lectinas	5
1.3 Lectinas com atividade antimicrobiana	6
1.3.1 Mecanismo de ação das lectinas antimicrobianas	7
1.4 Microrganismos	8
1.4.1 Resistência microbiana	9
1.4.2 Bactérias	10
1.4.3 Fungos	12
1.5 Líquens	13
1.5.1 Líquen <i>Cladonia verticillaris</i>	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	16
3.1 Geral	16
3.2 Específicos	17
4. ARTIGO A SER PUBLICADO	18
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser fonte inesgotável de luz que ilumina e guia todos os meus passos e pelas pessoas especiais colocadas no meu caminho.

À minha orientadora Profa. Dra. Luana, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Michele Dalvina, pela paciência e por todo apoio dado.

À Profa. Dra. Patrícia Paiva, pela orientação durante meu estágio em docência.

Aos meus pais Ana e Antônio e aos meus irmãos Amanda e Samuel, que mesmo distantes fisicamente, me apoiaram sempre.

Ao meu esposo Yuri, por sua paciência, amor e compreensão, que em muito contribui para a realização de mais uma etapa na minha formação.

À minha filhinha Ana Beatriz, fonte de estímulo para a conclusão desse trabalho.

Aos colegas Thiago Henrique e Francis, minha eterna gratidão, pela imensa e incondicional colaboração.

Aos colegas do laboratório de Glicoproteínas, em especial : Emmanuel, Tatiane, Nataly, Lidiane, Maiara, Giselly, Fernando, Romero, Raiana, Cynarha, Elba e Mércia, Priscila, Bernardo, pelos momentos compartilhados.

À Eliane, pela amizade e força.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Bioquímica da UFPE, Seu João, Miron, Djalma e Maria.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento concedido.

Agradeço, enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram a concluir esse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interações carboidrato-lectina na superfície das células.	2
Figura 2. Representação esquemática da hemaglutinação por lectinas.	3
Figura 3. Quitina, polímero de N-acetilglicosamina, principal constituinte da parede celular da maioria dos fungos.	9
Figura 4. Ilustração esquemática da parede celular das bactérias gram-positivas (A) e gram-negativas (B), e estrutura do peptideoglicano (C).	12
Figura 5. <i>Cladonia verticillaris</i> .	15

ARTIGO

Figure 1. ClaveLL isolated from F ₁ through gel filtration chromatography using Sephadex G-100 column (HA in log scale).	32
Figure 2. Growth zones (mm) of the fungi <i>F. solani</i> (A), <i>F. oxysporum</i> (B), <i>T. mentagrophytes</i> (C) and <i>M. gypseum</i> (D) in PDA medium.	34
Figure 3. Growth zones (mm) of the fungi <i>T. rubrum</i> (A), <i>T. cutaneum</i> (B), <i>T. asahi</i> (C) and <i>F. lateritium</i> (D) in PDA medium.	35
Figure 4. Antifungal activity of E (A), F ₁ (B) and ClaveLL (C).	36

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Summary of ClaveLL purification. **31**

Table 2. MIC and MBC of ClaveLL against bacteria species. **33**

RESUMO

Proteínas antimicrobianas, entre elas as lectinas, despertam o interesse de muitos pesquisadores, uma vez que podem ser usadas como agentes biológicos contra infecções microbianas. Esse trabalho descreve atividades antibacteriana e antifúngica de uma lectina e de outras preparações obtidas do líquen *Cladonia verticillaris*, contra microorganismos de importância médica. A lectina ClaveLL foi purificada através de um protocolo previamente definido. O líquen foi submetido à extração com tampão fosfato de sódio pH 7,0 (PBS), seguida de filtração e centrifugação para obtenção do extrato bruto (E). Foi realizado um fracionamento com sulfato de amônio a 30 %. A fração protéica obtida por centrifugação (F₁) foi submetida à cromatografia de exclusão molecular utilizando a matriz Sephadex G-100 para a obtenção da lectina pura e ativa. A atividade antibacteriana foi testada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. ClaveLL apresentou atividade antimicrobiana contra todas as espécies testadas, com maior ação inibitória sobre o crescimento de *E. coli*, contra a qual revelou menor Concentração Mínima Inibitória (7,18 mg/mL), embora a menor Concentração Mínima Bactericida (57,4 mg/mL) tenha sido detectada contra *E. faecalis*. Nos ensaios antifúngicos, foram avaliadas preparações de E, F₁ e ClaveLL contra os dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporon cutaneum* e *Trichosporon asahi*. A atividade antifúngica também foi avaliada contra os fitopatogênicos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium lateritium*, os quais são patógenos oportunistas que podem causar infecções graves em humanos. ClaveLL foi mais ativa contra *T. rubrum* com um percentual de inibição de 35 % em relação ao controle negativo (PBS). E e F₁ apresentaram maior atividade de inibição de crescimento contra *T. mentagrophytes* (35 %) e *F. solani* (42,9 %), respectivamente. Os resultados indicam ClaveLL e outras preparações obtidas de *C. verticillaris* como potenciais agentes antimicrobianos úteis para aplicações biotecnológicas com enfoque na saúde humana.

Palavras-chave: lectina; *Cladonia verticillaris*; ação antibacteriana; ação antifúngica.

ABSTRACT

Antimicrobial proteins, including lectins, arouse the interest of many researchers, since they can be used as biological agents against microbial infections. This work describes the antibacterial and antifungal activities of a lectin and other preparations obtained from the lichen *Cladonia verticillaris* against microorganisms of medical importance. ClaveLL lectin was purified using a protocol previously defined. The lichen was submitted to extraction with sodium phosphate buffer pH 7.0 (PBS), followed by filtration and centrifugation to obtain crude extract (E). Was made a fractionation with 30 % ammonium sulfate. The protein fraction obtained by centrifugation (F₁) was subjected to molecular exclusion chromatography using Sephadex G-100 matrix to obtain pure and active lectin. The antibacterial activity was tested against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. ClaveLL showed antibacterial activity against all tested species, with higher inhibitory effect on growth of *E. coli*, against which showed a lesser Minimum Inhibitory Concentration ($7.18 \mu\text{g mL}^{-1}$), while the lower Minimum Bactericidal Concentration ($57.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) was detected against *E. faecalis*. In the antifungal assays, were evaluated E, F₁ and ClaveLL preparations against the dermatophyte fungi *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporon cutaneum* and *Trichosporon asahi*. The antifungal activity was also evaluated against the pathogens of plant *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium lateritium*, which are opportunistic pathogens that can cause serious infections in humans. ClaveLL was more active against *T. rubrum* with an inhibition percentage of 35 % relation to negative control (PBS). E and F₁ showed higher activity of growth inhibition against *T. mentagrophytes* (35 %) and *F. solani* (42.9 %), respectively. The results indicate ClaveLL and other preparations obtained from *C. verticillaris* as potential antimicrobial agents useful for biotechnological applications with a focus on human health.

Key words: lectin, *Cladonia verticillaris*, antibacterial action, antifungal action.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Histórico e conceito

O estudo das lectinas iniciou no final do século 19 quando foram acumuladas evidências da presença de proteínas que aglutinavam eritrócitos, as quais foram denominadas hemaglutininas. Em 1888, Peter Hermann Stillmark avaliando a toxicidade da *Ricinus communis* (mamona) apresentou em sua tese de doutorado a mais antiga hemaglutinina descrita, a qual denominou ricina, extraída das sementes da mamona e sendo bastante tóxica (SHARON; LIS, 2004). No entanto a era moderna da lectinologia surgiu quase cem anos depois (BIES *et al.*, 2004), sendo o termo lectina introduzido em 1954 por Boyd e Shapleigh, devido a capacidade de algumas proteínas se ligarem a carboidratos aglutinando, de forma seletiva, eritrócitos de um grupo sanguíneo específico.

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas de origem não-imune, contendo dois ou mais sítios de ligação para mono ou oligossacarídeos (SADIK; YAN, 2007). O termo “origem não-imune” é bastante utilizado quando se refere a lectinas, para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que também aglutinam células; porém, enquanto os anticorpos possuem estruturas similares, as lectinas diferem entre si na estrutura tridimensional, peso molecular e composição de aminoácidos. São expressas nas células de muitas espécies, estando envolvidas em vários processos celulares essenciais relacionados às funções vitais dos organismos (NAKAHARA; RAZ, 2008). Sua capacidade de interagir de forma específica com carboidratos, reconhecendo glicoconjugados na superfície celular é responsável por suas importantes e diversas atividades biológicas (MORENO *et al.*, 2008).

Lectinas endógenas medeiam vários processos, tais como adesão célula-célula e célula-matriz extra-celular (figura 1), proliferação celular e apoptose. Muitas são conhecidas por serem mediadoras da inflamação e

quimioatraentes (KURMYSHKINA *et al.*, 2010), como por exemplo as selectinas, galectina-3 e galectina-9 (WORMALD; SHARON, 2004). Lectinas de macrófagos, células dendríticas e células natural killer estão envolvidas na proteção anti-tumoral, anti-microbiana e anti-viral de um organismo (ARESCHOUG; GORDON, 2008; YOKOYAMA; RILEY, 2008). Lectinas tipo C têm sido implicadas no reconhecimento de patógeno, endocitose e fagocitose (KERRIGAN; BROWN, 2009).

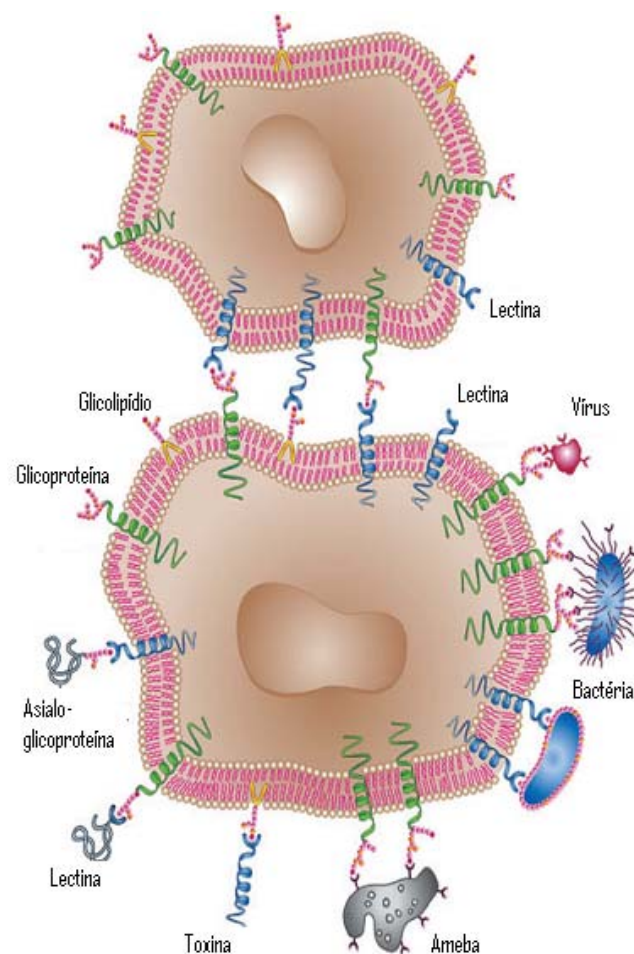


Figura 1 - Interações carboidrato-lectina na superfície das células. Fonte: SHARON; LIS, 2004.

1.1.2 Detecção

As lectinas podem ser detectadas através da atividade hemaglutinante, na qual interagem por meio de seus sítios de ligação com os carboidratos

presentes na superfície dos eritrócitos, como ilustrado na figura 1, formando uma rede de aglutinação. Os eritrócitos utilizados para detecção de lectinas podem ser tratados enzimaticamente (tripsina, papaína) ou quimicamente (glutaraldeído ou formaldeído) e podem ser provenientes de sangue humano ou de outras espécies (COELHO; SILVA, 2000).

Agentes químicos como taninos, lipídios ou cátions divalentes em altas concentrações podem promover dispersão dos eritrócitos. Por isso, a garantia de que o agente aglutinante é a lectina pode ser fornecida pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, em que é usada uma solução contendo carboidratos específicos. A ocupação dos sítios de ligação da lectina com os carboidratos livres bloqueia sua interação com os carboidratos dos eritrócitos, impedindo a formação da rede de aglutinação (CORREIA *et al.*, 2008).

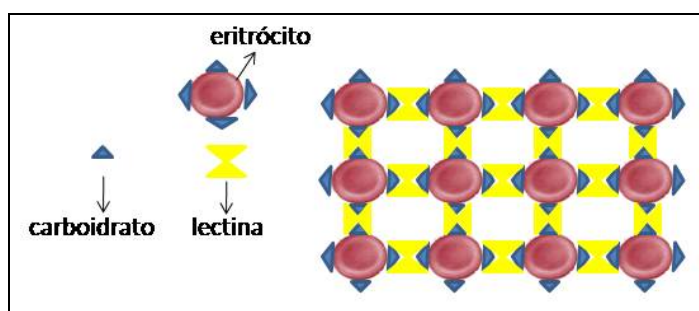


Figura 2 - Representação esquemática da hemaglutinação por lectinas.

1.1.3 Purificação

A primeira etapa na purificação lectínica é a extração utilizando solução salina ou tampão, onde as células que contêm as proteínas são rompidas, liberando-as na solução denominada extrato bruto (LEHNINGER *et al.*, 2006). A partir desse extrato é realizada a atividade hemaglutinante, que identifica se há presença de lectina na amostra.

O extrato bruto é então submetido a um fracionamento, onde as proteínas são separadas em diferentes frações. Um tipo de fracionamento bastante utilizado é o salino com sulfato de amônio, onde a solubilidade das proteínas, por possuírem muitos grupos carregados, é aumentada com a adição de sal (*salting in*), e começa a decrescer à medida que mais sal é

adicionado (*salting out*) por desfazer a camada de solvatação ao redor das mesmas.

A partir das frações obtidas, são realizadas técnicas cromatográficas que permitem purificar as lectinas de acordo com suas propriedades, tais como peso molecular (cromatografia de exclusão molecular), carga (cromatografia de troca iônica) e a especificidade de ligação (cromatografia de afinidade), sendo que alguns protocolos de purificação chegam a utilizar os três métodos de cromatografia para obter lectinas puras (WANG *et al.*, 2003).

A cromatografia de exclusão molecular, técnica utilizada para obter a lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (SILVA *et al.*, 2009), é também conhecida como filtração em gel, permeação em gel, ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita, onde as moléculas pequenas se deslocam com velocidade menor, pois precisam passar através dos poros do gel ou suporte. As moléculas grandes apresentam uma maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, emergindo mais rapidamente, promovendo a separação dos componentes de acordo com o peso molecular. Um dos géis mais comumente usados como matriz de exclusão molecular é o dextrano (Sephadex), polissacarídeo obtido a partir da fermentação da sacarose por ação bacteriana, que quando tratado com substâncias químicas, produz ligações cruzadas nas suas cadeias.

1.1.4 Ocorrência das lectinas

Apesar de terem sido encontradas e isoladas inicialmente em plantas (SHARON; LIS, 2004), atualmente sabe-se que as lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em organismos procariontes e eucariontes. Bactérias (ZINGER-YOSOVICH *et al.*, 2011), nematóides (HARCUS *et al.*, 2009), algas (AMBROSIO *et al.*, 2003), plantas (ALIZADEH *et al.*, 2011), anfíbios (RIERA *et al.*, 2003), esponjas marinhas (KAWSAR *et al.*, 2011), crustáceos (SONG *et al.*, 2010), cnidários (IMAMICHI; YOKOYAMA, 2010), fungos (ZHANG *et al.*, 2010) e líquens (SILVA *et al.*, 2009) têm sido fonte de lectinas.

1.2 Aplicações biotecnológicas das lectinas

As aplicações biotecnológicas das lectinas são muito amplas. Devido as suas propriedades de ligação a carboidratos, as lectinas têm sido amplamente usadas como ferramentas moleculares para o estudo da arquitetura e da dinâmica de carboidratos na superfície das células. Elas têm sido exploradas para tais aplicações práticas, como nas últimas duas décadas, em que as lectinas de plantas foram utilizadas para diferenciar tumores malignos e benignos e o grau de glicosilação associado à metástase (LIU *et al.*, 2010). Da mesma forma, vários estudos demonstraram atividade antitumoral de lectinas sobre uma grande variedade de células malignas (DE MEJÍA *et al.*, 2005). Uma lectina isolada de sementes de *Canavalia grandiflora* foi denominada como alvo potencial para novas terapias analgésicas e antiinflamatórias, por ter sido capaz de inibir a migração neutrofílica e a hipernocicepção inflamatória, sendo a migração neutrofílica responsável pelos danos teciduais nas doenças inflamatórias (NUNES *et al.*, 2009).

Algumas lectinas têm sido exploradas na biotecnologia devido a seu potencial inseticida. Lectinas da casca, do cerne e das folhas da *Myracrodruon urundeuva*, popularmente conhecida como “aroeira-do-sertão”, amplamente distribuída no Brasil, assim como a lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (SILVA *et al.*, 2009) mostraram grande atividade inseticida contra cupins *Nasutitermes corniger*, espécie responsável por deteriorar madeiras nas estruturas dos edifícios (NAPOLEÃO *et al.*, 2011). Algumas dessas lectinas, além de atividade termiticida, também foram capazes de inibir o desenvolvimento larval do mosquito *Aedes aegypti*, responsável por transmitir a dengue, doença que não possui vacina para seu agente etiológico e cujo controle está associado ao combate ao vetor (SÁ *et al.*, 2009).

Já foram encontradas também lectinas com potencial moluscicida, o que pode representar uma ferramenta biotecnológica para a erradicação do vetor da esquistossomose, doença tropical que afeta milhões de pessoas e que está intimamente associada com caramujos aquáticos da espécie *Biomphalaria glabrata*. (SANTOS *et al.*, 2010).

Recentemente, foi estudada a ação de lectinas de plantas contra nematóides que causam grandes danos aos pinheiros. Essas moléculas foram ativas em reduzir significativamente a população de nematóides quando comparadas ao controle. Os genes dessas lectinas, portanto, parecem ser candidatos promissores para serem usados em engenharia genética na resistência a nematóides em pinheiros (GAOFU *et al.*, 2008).

1.3 Lectinas com atividade antimicrobiana

Dentre as proteínas com atividade antimicrobiana estudadas, destaque tem sido dado para as lectinas, já que grande parte destas tem apresentado atividade antibacteriana e antifúngica.

Uma lectina isolada do cerne da aroeira-do-sertão foi ativa em inibir bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de inibir fungos fitopatogênicos. Essa lectina representa o primeiro peptídeo bioativo encontrado em cerne e pode estar relacionada com a resistência dessa madeira à degradação (SÁ *et al.*, 2009). Outra lectina purificada das sementes da pitanga, *Eugenia uniflora*, foi capaz de inibir fortemente o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp.* (OLIVERIA *et al.*, 2008). A partir das folhas de *Phthirusa pyrifolia*, popularmente conhecida no Brasil como “erva-de-passarinho” foi purificada uma lectina que mostrou efetiva atividade antimicrobiana contra bactérias (gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Fusarium lateritium* e *Rhizoctonia solani*) (COSTA *et al.*, 2010).

Lectinas isoladas de outras fontes naturais diferentes das plantas também têm apresentado atividade antimicrobiana. Por exemplo, a lectina isolada da esponja marinha *Halichondria okadai*, exibiu forte atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, como o *Bacillus megaterium* e o *Bacillus subtilis*. No entanto, ela não inibiu o crescimento de bactérias gram-negativas, como a *Salmonella typhi* e a *Escherichia coli* (KAWSAR *et al.*, 2011). Outra lectina, purificada da hemolinfa do molusco bivalve *Ruditapes philippinarum*, reduziu marcadamente o crescimento da bactéria marinha

Alteromonas haloplanktis. Esse resultado sugere que a lectina, devido à sua propriedade bacteriostática, possa contribuir para os mecanismos de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Até mesmo lectinas isoladas da pele do anfíbio *Bufo arenarum*, “sapo-da-areia”, espécie nativa da região centro-sul da América do Sul, mostraram forte atividade bacteriostática contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e cepas selvagens de *Escherichia coli* e *Proteus morganii*) e gram-positivas (*Enterococcus faecalis*) (RIERA *et al.*, 2003).

O isolamento dessas variadas lectinas com atividade antimicrobiana mostra o enorme potencial das fontes naturais na busca de compostos alternativos, diante da crescente resistência microbiana. Além disso, a capacidade que as lectinas têm de reagir com carboidratos expostos na superfície de microrganismos é uma importante ferramenta para a análise de carboidratos da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas; lectinas podem ter especificidade para uma ampla variedade de carboidratos complexos, tais como o ácido teicóico, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, levando à identificação de bactérias patogênicas com base na reação de aglutinação seletiva entre lectinas e bactérias. O estudo realizado por Athamna *et al.* (2006) constatou que essa interação lectina-bactéria é uma ótima ferramenta para a identificação rápida de espécies de *Mycobacterium*.

1.3.1 Mecanismo de ação das lectinas antimicrobianas

Tem sido proposto que as proteínas com ação antibacteriana, dentre elas as lectinas, formam um canal na membrana celular e a célula morre devido à saída do conteúdo celular, sendo este mecanismo diferente dos antibióticos (TALAS-OGRAS *et al.*, 2005). Quanto aos fungos, têm sido proposto que as lectinas, ao se ligarem em suas estruturas, interferem na germinação dos esporos, provavelmente em um estágio muito inicial do processo, prorrogando o período de latência que precede a germinação. Além disso, proteínas ligadoras de quitina (polímero de N-acetilglicosamina, mostrado na figura 3, que constitui o principal componente da parede celular dos fungos) afetam o crescimento e desenvolvimento de fungos por interferirem

na síntese e/ou deposição da quitina na parede celular (SELITRENNIKOFF, 2001).

1.4 Microrganismos

Os microrganismos são os menores seres vivos existentes; encontrados em uma vasta diversidade de ambientes, eles desempenham importantes papéis na natureza. Caracterizam-se pela sua heterogeneidade, tendo como única característica comum o pequeno tamanho. Acredita-se que cerca de metade da biomassa do planeta seja constituída pelos microrganismos, sendo encontrados em quase todos os ambientes, tanto na superfície (DRENKARD, 2003) como no mar e subsolo (MOSCATELLI *et al.*, 2005). Podem ser isolados de ambientes com temperaturas altas (HE *et al.*, 2000) , de regiões polares com temperaturas inferiores a -10°C, de ambientes extremamente ácidos (DOPSON; TAYLOR, 2006) ou básicos e de ambientes extremamente pobres em nutrientes (EGLI, 2010).

Na natureza, os microrganismos desempenham um importante papel nos processos geoquímicos, tais como o ciclo do carbono e do nitrogênio, sendo importantes nos processos de decomposição de substratos e sua reciclagem. Eventualmente, esses microrganismos causam doenças no homem, em outros animais e em plantas, sendo denominados como patogênicos. Apesar dos enormes avanços em relação ao tratamento de doenças infecciosas, estas vêm se tornando um tema preocupante, em virtude do crescente surgimento de linhagens bacterianas cada vez mais resistentes às drogas.

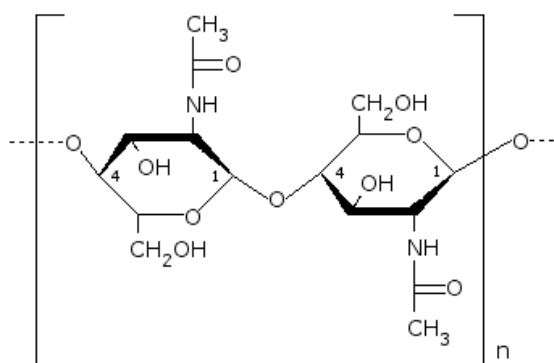


Figura 3 - Quitina, polímero de N-acetilglicosamina, principal constituinte da parede celular da maioria dos fungos. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Chitin.png>

1.4.1 Resistência microbiana

Em 1905, Ehrlich e seus colaboradores descobriram o fenômeno da resistência às drogas, ao notarem que em culturas de tripanossomas africanos tratados com arsênico havia a sobrevivência de alguns organismos da mesma população microbiana. Eles observaram que infecções por tripanossomas tratadas com doses baixas de arsenicais reincidiam, e que um novo tratamento não adiantava porque os tripanossomas haviam desenvolvido resistência a qual passava a ser hereditária (TAVARES, 2000).

Resistência microbiana está relacionada à formação de cepas não sensíveis aos antimicrobianos, capazes de se multiplicar mesmo aumentando-se a dose terapêutica convencional. Apesar de esse fenômeno ser algumas vezes decorrente da evolução natural dos microrganismos, ganha importância pelo uso desmedido e irracional das substâncias antimicrobianas nas práticas médicas, agrárias e veterinárias. Esse problema de saúde pública mundial torna-se um obstáculo para o sucesso dos tratamentos e diminui o número de antimicrobianos válidos disponíveis (DA SILVA *et al.*, 2010).

Os microrganismos apresentam genes que codificam mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas; tal fenômeno genético pode ser originado por mutações durante o processo reprodutivo dos microrganismos ou através da importação de genes causadores desse fenômeno através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação (CUNHA, 1998).

Diante do quadro mundial de resistência microbiana, têm-se aumentado o número de pesquisas para a descoberta de novos antimicrobianos a partir de fontes naturais, principalmente plantas. Elas produzem uma grande variedade de proteínas de defesa em seus tecidos para lidar contra os ataques de patógenos microbianos. Tais proteínas despertam grande interesse, devido às atividades biológicas produzidas em resposta ao meio ambiente, e por apresentarem ação antimicrobiana com grande frequência (HAIDA *et al.*, 2007).

1.4.2 Bactérias

Bactérias, do grego *bakteria*, bastão, são organismos procariontes (não possuem envoltório nuclear), encontrados na forma isolada ou em colônias. Podem ser aeróbias (vivem na presença de ar), anaeróbias (vivem na ausência de ar), ou ainda anaeróbias facultativas. As bactérias constituem um dos grupos de organismos mais antigos, com evidência encontrada em rochas de 3,8 bilhões de anos (CRAPEZ, 2002).

De acordo com a constituição da parede celular, as bactérias podem ser divididas em gram-positivas e gram-negativas. A parede celular das gram-positivas apresenta uma camada espessa formada de 40 a 90% do seu peso de peptidoglicano, também denominado mureína; esse constitui um heteropolissacarídeo formado pelo ácido *N*-acetilmurâmico, *N*-acetilglicosamina e alguns aminoácidos (figura 4). Já a parede celular das gram-negativas é formada de uma quantidade pequena de peptidoglicano (não excedendo a 10% do seu peso seco) e de uma membrana externa constituída por uma dupla camada lipídica.

Os estafilococos são bactérias gram-positivas, não esporuladas mais resistentes no meio ambiente, sobrevivendo por meses em amostras clínicas secas, além de serem resistentes ao calor e a concentração aumentada de sal. O *Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos sadios podem albergar essa bactéria na nasofaringe, ocasionalmente na pele e, a partir destes sítios, o *S. aureus* pode contaminar a pele e membranas mucosas do paciente, objetos ou outros pacientes por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais por conta dos

fatores de virulência. Caracteriza-se por produzir pústulas, abscessos ou furúnculos, estando associado também a impetigo, feridas infeccionadas, artrite, meningite, endocardite etc. Em 1945 já haviam estafilococos resistentes às penicilinas com índices de resistência de 12 a 22% (MOREIRA *et al.*, 1995). Já foram descritos no Brasil casos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* parcialmente resistentes aos antibióticos mais potentes, como a Vancomicina (ÁLAMO *et al.*, 1999).

Os enterococos também são bactérias gram-positivas, encontradas normalmente no intestino humano; entre outras infecções, pode causar endocardite e infecção urinária. Apresentam importância crescente como causadores de infecção hospitalar, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento destas infecções. Os mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium*, com grande capacidade de colonização de pacientes e de contaminação de superfícies ou equipamentos utilizados em hospitais (HUYCKE *et al.*, 1998).

A maior e mais heterogênea família de bactérias gram-negativas de importância médica é a das enterobactérias, que caracterizam-se por se apresentarem como bacilos gram-negativos. São responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias. Nas infecções hospitalares, as enterobactérias que atualmente predominam são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. A *Klebsiella pneumoniae*, como o próprio nome sugere, é uma cepa de *Klebsiella* que causa pneumonia em seres humanos; ela também pode causar infecção urinária e infecções abdominais. Essa bactéria geralmente afeta pessoas com sistema imunológico baixo, como pacientes de hospitais, diabéticos e pessoas com doença pulmonar crônica, sendo descritas situações em que sua presença se tornou endêmica (DIPERSIO *et al.*, 2005).

Desde a década de 80, quando houve surtos em unidades neonatais de terapia intensiva, têm-se aumentado a preocupação com as cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes (BOSZCZOWSKI *et al.*, 2005). Recentemente, as enterobactérias alarmaram a população brasileira com a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que

confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos; esses antimicrobianos compreendem uma classe já utilizada no tratamento de infecções envolvendo *Enterobacteriaceae* multirresistentes (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota normal do intestino, sendo a causa de algumas doenças quando se dissemina para outros órgãos, como por exemplo, promovendo infecções do trato urinário.

O *Bacillus subtilis* é uma espécie de bactéria gram-positiva habitante natural do solo; produz antibióticos, enzimas e fito-hormônios que proporcionam benefícios para as plantas (ARAÚJO, 2008).

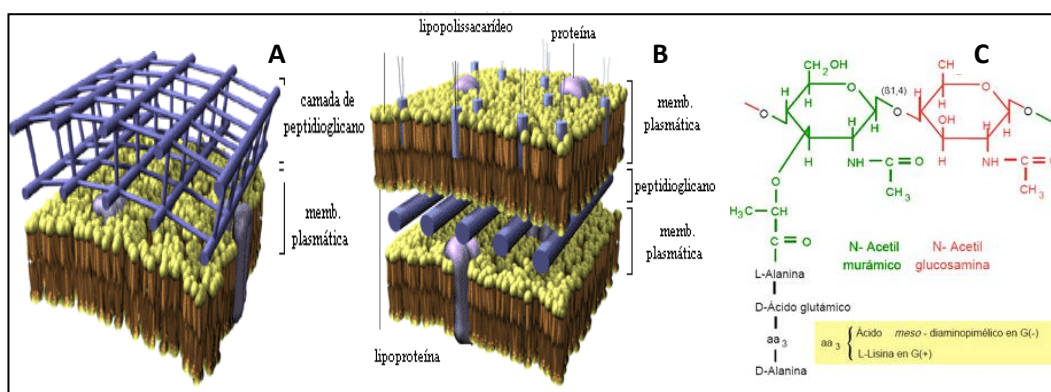


Figura 4 - Ilustração esquemática da parede celular das bactérias gram-positivas (A) e gram-negativas (B), e estrutura do peptidoglicano (C). Retirado de <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar35b.htm>

1.4.3 Fungos

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água. Os fungos de interesse médico, agentes de micoses, são de dois tipos morfológicos: leveduras, que são unicelulares, e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares; esses últimos normalmente não

fazem parte da microbiota animal e, portanto, o homem não é um reservatório importante para esse grupo.

Espécies do gênero *Fusarium* são sabidamente fitopatógenas, sendo encontradas como sapróbios do solo. Apesar disso, em humanos algumas espécies podem causar um amplo espectro de doenças, desde infecções superficiais até doenças angioinvasivas. As formas graves ocorrem em pacientes imunocomprometidos, especialmente em transplantados de medula; as espécies mais envolvidas em infecções humanas são *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *F. moniliforme* que, usualmente, apresentam como modo de infecção a via aérea ou por continuidade da pele, iniciada por onicomicose ou outra forma de infecção cutânea. Clinicamente, pode ocorrer pneumonia, sinusite, artrite, osteomielite e endoftalmite (TELLES, 2004). Já foi relatado caso em que a espécie *Fusarium lateritium* foi o agente causador de fungemia em pacientes HIV positivos (CAMBUIM *et al.*, 2007).

Os dermatófitos são fungos que têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de humanos e outros animais, causando infecções denominadas dermatofitoses. As dermatofitoses são micoses superficiais ocorrentes em pêlos, unhas e pele, e cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Trichophyton* (*Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*), *Microsporum* (*Microsporum gypseum*) e *Epidermophyton*. Estes são fungos filamentosos e constituem um dos grupos causadores de infecções fúngicas mais freqüentes na prática dermatológica.

O gênero *Trichosporon* está dentro do grupo de fungos ditos emergentes; são fungos leveduriformes de grande importância médica, que tem contribuído para o aumento da mortalidade de indivíduos imunodeprimidos. Apesar da espécie *Trichosporon cutaneum* estar mais relacionada com lesões cutâneas, espécies como a *Trichosporon asahi* são mais freqüentemente envolvidas com infecções invasivas (GIRMENIA *et al.*, 2005).

1.5 Líquens

Líquen é uma associação simbiótica e mutualista, estável e auto-sustentável, de um fungo (micobionte) e uma ou mais algas e/ou cianobactérias

(fotobiontes) (KIRK *et al.*, 2008). São capazes de fixar alimentos do ar atmosférico e absorver sais minerais de substratos, para sua alimentação. Em geral, cada membro de uma associação mutualista é especializado para executar uma função complementar ao outro.

Os líquens têm papéis de importância ecológica e econômica. Alguns têm papel na formação e na prevenção da degradação do solo, bem como contribuem para sua qualidade. Segundo Raven *et al.* (2001), um importante fator ecológico atribuído a alguns líquens é a fixação de nitrogênio no solo. Outros são consumidos por macroinvertebrados tais como caracóis, lesmas e insetos. Em alguns países, determinados gêneros têm sido usados até mesmo para fazer um tipo de farinha para pães. Líquens também têm uma longa história de uso de suas propriedades medicinais e em tinturaria (BATTIS *et al.*, 2004).

As espécies liquênicas são bioindicadoras de ambientes e da qualidade do ar, indicando desde a umidade do ar até a acidez do substrato rochoso e pH, além de demonstrarem alta sensibilidade a inúmeros tipos de poluentes, tais como SO₂, fluoretos, ozônio, óxidos nitrogenados e nitrato de peroxiacetil (PAN). Podem ainda ser usados para calcular o efeito biológico de poluentes, identificando mudanças na comunidade (LOPPI *et al.*, 1998).

1.5.1 Líquen *Cladonia verticillaris*

A espécie *Cladonia verticillaris* (figura 5) é classificada dentro do Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycotina, Ordem Lecanorales, Família Cladoniaceae, Gênero *Cladonia*. É considerada como endêmica da costa leste do Brasil, encontrada do Rio Grande do Sul à Paraíba (AHTI *et al.*, 1993), sendo comum também encontrá-la em áreas de cerrado-tabuleiros arenosos do interior nordestino.

C. verticillaris tem sido utilizada como uma espécie biomonitora para detecção de poluentes atmosféricos em Belo Jardim-PE (MOTA FILHO *et al.*, 2007), na região metropolitana do Recife (SILVA, 2002) e em Vertente do Lério, no interior de Pernambuco (CUNHA, 2005) respondendo às agressões do ambiente. É um líquen extremamente sensível à variação microclimática,

que resulta na produção de diferentes concentrações de pigmentos e fenóis, em resposta a uma maior ou menor exposição ao sol (LEGAZ *et al.*, 1986). Quando submetida a pouca umidade a espécie apresenta cor branco-acinzentada, e amarronzado quando exposta diretamente a luz solar.



Figura 5 - *Cladonia verticillaris*. Fonte: <http://www.canalciencia.ibict.br>

Os líquens produzem metabólitos secundários característicos que apresentam várias atividades biológicas. No caso da espécie *C. verticillaris*, os principais são: ácidos fumarprotocetrárico (FUM), protocetrárico (PRO) e atranorina (ATR) (MARCELLI, 2006). O FUM extraído dessa espécie possui ações antiinflamatória, antinociceptiva e antipirética (SANTOS, 2003), bem como ação antitumoral (SANTOS *et al.*, 1997) e efeito alelopático (YANO-MELO *et al.*, 1999).

A ação antimicrobiana dos metabólitos liquênicos tem sido estudada desde 1944 por Burkholder e colaboradores, e desde então várias substâncias foram identificadas como agentes antibióticos. As substâncias ativas são em geral depsídeos, depsídonas e ácidos úsnicos, dentre outras classes de compostos (MULLER, 2001).

Lectinas de líquens não são freqüentemente purificadas, e poucas aplicações biológicas e biotecnológicas têm sido descritas para essas moléculas, quando de origem liquênica. Alguns autores como Elifio *et al.* (2000) têm sugerido que a possível função fisiológica de tais moléculas nesses organismos seja o estabelecimento da simbiose.

2. JUSTIFICATIVA

Os componentes dos extratos liquênicos apresentam inúmeras atividades biológicas. Alguns testes com líquens comprovaram a ocorrência freqüente de metabólitos com propriedades antibiótica, antimicobacteriana, antiviral, antitumoral, analgésica e antipirética (MULLER, 2001).

Apesar de um dos metabólitos extraídos da espécie *Cladonia verticillaris*, o ácido fumarprotocetrárico, ter apresentado atividade antitumoral, antimicrobiana e propriedade alelopática (YANO-Melo *et al.*, 1999), apenas um trabalho descreveu uma importância biológica, atividade termiticida, da lectina extraída dessa espécie (SILVA *et al.*, 2009).

A obtenção de uma lectina do líquen *C. verticillaris* (ClaveLL) por um protocolo relativamente econômico e simplificado, rendendo quantidades razoáveis da lectina, associada a atividade antimicrobiana que algumas lectinas de plantas têm apresentado (COSTA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2005) despertou o interesse em verificar, através desse trabalho, a atividade antimicrobiana de ClaveLL contra fungos e bactérias de importância médica.

Diante da realidade, em que se observa um aumento na taxa de resistência dos microrganismos, principalmente aqueles oportunistas que afetam geralmente os pacientes hospitalizados e imunossuprimidos (chegando a provocar sua morte), têm aumentado a cada dia a busca por novas moléculas alternativas com atividade terapêutica. Os produtos naturais surgem como fonte dessas novas moléculas, com grande potencial antimicrobiano (SILVA; RANGEL, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de uma lectina purificada do líquen *Cladonia verticillaris* (ClaveLL) como agente antimicrobiano, frente à bactérias e fungos de importância médica.

3.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina ClaveLL através de métodos de extração, precipitação protéica e cromatografia;
- Quantificar a presença protéica nas preparações obtidas do líquen;
- Determinar a presença lectínica nas preparações, através de ensaios de AH;
- Determinar se há atividade antimicrobiana da lectina frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas de importância médica, bem como a concentração mínima inibitória;
- Avaliar a possível atividade antifúngica das preparações obtidas do líquen *C. verticillaris* contra diferentes espécies de importância médica.

4. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *Biologicals*

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Cladonia verticillaris* LICHEN
PREPARATIONS ON BACTERIA AND FUNGI OF MEDICAL IMPORTANCE**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Cladonia verticillaris* LICHEN
PREPARATIONS ON BACTERIA AND FUNGI OF MEDICAL IMPORTANCE**

Dalila B.M. Ramos ¹, Francis S. Gomes¹, Thiago H. Napoleão¹, Patrícia M.G. Paiva¹, Michele D.C. Silva², Luana C.B.B. Coelho¹

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

² Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

***Corresponding author: Luana C. B.B. Coelho**

e-mail address: luanacassandra@terra.com.br

ABSTRACT

Cladonia verticillaris lichen lectin (ClaveLL) was purified using a protocol previously defined to be evaluated for its potential antimicrobial activity. Initially, the lichen was submitted to extraction with sodium phosphate buffer pH 7.0, followed by filtration and centrifugation to obtain crude extract. Was conducted a salt fractionation with 30% ammonium sulfate. The protein fraction obtained by centrifugation was subjected to molecular exclusion chromatography using Sephadex G-100 matrix to obtain pure and active lectin. ClaveLL showed antibacterial activity against all tested species, with greater inhibitory effect on growth of *Escherichia coli*, against which showed a lesser Minimum Inhibitory Concentration ($7.18 \mu\text{g mL}^{-1}$), while the lower Minimum Bactericidal Concentration ($57.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) was detected against *Enterococcus faecalis*. In the antifungal assay, was evaluated crude extract, fraction and ClaveLL preparations. ClaveLL was most active against *Trichophyton rubrum* with an inhibition percentage of 35% compared to negative control (phosphate buffer). Extract and fraction showed better activity on growth inhibition of *Trichophyton mentagrophytes* (35%) and *Fusarium solani* (42.9%). The results indicate the potential of ClaveLL and other preparations obtained from *C. verticillaris* as antibacterial agents useful for biotechnological applications with a focus on human health.

Key words: lichen lectin, *Cladonia verticillaris*, antimicrobial activity.

1. Introduction

Despite enormous advances regarding the treatment of infectious diseases, they are becoming an issue of concern, due to the growing emergence of bacterial strains increasingly resistant to drugs and opportunistic fungi that cause serious infections in humans.

Microbial resistance is a genetic phenomenon, in which the microorganisms have genes that encode the biochemical mechanisms that prevent drugs action. May be caused by mutations in the reproductive process of the microorganisms or by importing genes that cause this phenomenon through transduction, conjugation and transformation mechanisms (Cunha., 1998).

Although this phenomenon, is sometimes due to the natural evolution of microorganisms, gains importance by the excessive and irrational use of antimicrobial substances in medical, agricultural and veterinary practices. Given this global picture of microbial resistance, have increased the number of searches for new antibiotics from natural sources.

Lichens are symbiotic associations and mutual societies, stable and sustainable from a fungus (fungal partners) and one or more algae and / or cyanobacteria (algal) (Kirk *et al.*, 2008). Produce characteristic secondary metabolites that exhibit various biological activities.

The species *Cladonia verticillaris* is regarded as endemic to the eastern coast of Brazil, found in Rio Grande do Sul to Paraíba. (Ahti *et al.*, 1993) and is also common to find in the cerrado, sandy tablelands of the interior Northeast. Produces secondary metabolites such as fumarprotocetraric and protocetraric acids and atranorin. The fumarprotocetraric acid extracted from this species has inflammatory, antinociceptive and antipyretic actions (Santos, 2003) as well as antitumoral (Santos *et al.*, 1997) and allelopathic effects (Yano-Melo *et al.*, 1999). A *C. verticillaris* lichen lectin, called ClaveLL, free of secondary metabolites, was purified through a simple and pre-established protocol and presented insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Silva *et al.*, 2009).

The antimicrobial activity of lichen-like metabolites have been studied since 1944, when Burkholder and coworkers began the investigations; since then several

substances were identified as antibiotic agents. Nevertheless few papers describe the biological activities of lectins purified from lichens.

Lectins are a heterogeneous group of proteins from non immune origin, containing two or more binding sites for mono or oligosaccharides (Yan and Sadik, 2007). Lectins isolated from different natural sources have shown activity against bacteria and fungi (Sá *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010; Kaws *et al.*, 2011) presenting as molecules with potential for future biotechnological applications. They can serve to differentiate bacterial species due the selective interaction that occurs between lectins and microorganisms (Athamna *et al.*, 2006).

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the purified lectin from the lichen *C. verticillaris* (ClaveLL) (Silva *et al.*, 2009) against gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria that have shown resistance to current drugs, as well as against fungi known as dermatophytes of the genus *Trichophyton* and *Microsporum* (that cause superficial mycoses occurring in hair, nails and skin), *Fusarium* species (that are opportunist pathogens and can cause serious infections in humans) and *Trichosporon* species (which are within the so-called emerging group of fungi and has contributed to increased mortality in immunocompromised individuals) (Girmenia *et al.*, 2005).

2. Materials and methods

Purification of ClaveLL

C. verticillaris lichen was collected at Alhandra City, State of Paraíba, Northeastern Brazil. *C. verticillaris* lichen lectin (ClaveLL) was obtained through a sequential purification protocol according to Silva *et al.* (2009). Lichen was dried at 28°C and an overnight extraction (10%, w/v) for 16 h at room temperature was performed in 0.15 M sodium phosphate buffer pH 7.0 containing 0.15 M NaCl (PBS), followed by filtration, centrifugation (3000 g , 4°C, 15 min). The crude extract (E) was 30% (w/v) ammonium sulphate treated for 4 h at 28°C. The 0–30% precipitate fraction (F₁) was obtained by centrifugation (3000 g , 4 °C, 15 min), submitted to protein quantification and applied (18 mg of protein) to a gel filtration chromatography containing 100 mL of Sephadex G-100 (1.4 x 63 cm). The molecular exclusion column

was eluted with PBS (flow rate of 20 mL/h); collected fractions were monitored by absorbance (UV 280nm) and hemagglutinating activity aiming to obtain pure and active ClaveLL.

Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity (HA) and HA inhibition assays were carried out in microtiter plates according to Correia *et al.* (2008). The evaluated preparations (50 μ L) were serially twofold diluted in 0.15 M NaCl prior to addition of 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes (50 μ L). The HA (titer) was defined as the lowest lectin concentration in the sample which showed hemagglutination and was examined visually through the absence of erythrocyte precipitation after incubation for 45 min. Specific HA (SHA) was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg mL^{-1}).

Protein content

Protein concentration was spectrophotometrically evaluated according to Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

Antibacterial activity

Gram-positive (*Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 and *Enterococcus faecalis* ATCC-6057) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC-25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-29665) bacterial strains were provided by Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Stationary cultures were maintained in nutrient agar (NA) and stored at 4°C. Bacteria were cultured in nutrient broth (NB) and incubated under permanent shaking at 37°C overnight. The culture concentrations were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 10^5 – 10^6 colony forming units (CFU). mL^{-1} . Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC) were determined according to Courvalin *et al.* (1988). ClaveLL (100 μ L, 0.184 μ g) was serially diluted (1:2048) in Nutrient Broth and 180 μ L of each dilution were applied in microtiter plates. Following, 20 μ L of microorganism suspension (exponential phase of growth; 1.5×10^8 CFU. mL^{-1} ;

0.5 in McFarland scale) were inoculated and the plates were incubated at 37°C for 24h. Control tubes contained NA medium and microorganism. Amoxiciline was used as positive control. MIC corresponds to the lowest lectin concentration able to inhibit the visible growth of microorganism. MBC was determined starting from the MIC assay. Dilutions of 1:10,000 of each MIC were performed and aliquots (10 µL) were sowed in Petri plates containing NA medium. The number of CFU grown in plates was determined. The MBC corresponds to the minimum concentration of sample that reduces the number of CFU to 0.1% of the initial concentration.

Antifungal activity

Trichopyton mentagrophytes (URM5541), *Microsporium gypseum* (URM6199), *Trichophyton rubrum* (URM5145), *Trichosporon cutaneum* (URM5743), *Trichosporon asahi* (URM5781), *Fusarium solani* (URM5796), *Fusarium oxysporum* (URM5845) e *Fusarium lateritium* (URM5844) were obtained from the Cultures Collection “Micoteca” (URM) of the Departamento de Micologia da Universidade Federal of Pernambuco (UFPE), Brazil. Antifungal activity was performed according to a modified assay presented by Wong and Ng (2005). Fungi were grown at 28°C on potato dextrose agar (PDA) in Petri plates for an 8–15 day period until the surfaces of the plates were completely covered by them. Fungal mycelium discs (0.625 cm in diameter) were removed from the peripheral part of the colonies. ClaveLL (100 µL; 1.67 mg mL⁻¹), E (100 µL; 9.43 mg mL⁻¹) and F₁ (100 µL; 40.45 mg mL⁻¹) were spread on solidified PDA medium in Petri plates (100 X 15 mm²) and a fungal mycelium disk was disposed in the center of the Petri plates. All assays were carried out in triplicate. PBS and nystatin (1 mg/mL) were used as negative and positive controls, respectively. The plates were incubated at 28°C for 72 h. Antifungal activity was indicated by reduction of the fungal growth zone (diameter) in the plates.

Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, Calif., USA) and data were expressed as a mean of replicates ± SD. Significant differences between treatment groups from the antifungal assays were analysed by Student’s t-test (significance at p < 0.05) using the Origin 6.0 program.

3. Results and discussion

C. verticillaris contain a lectin purified through a pre-established protocol by Silva *et al.* (2009) that use molecular exclusion chromatography with Sephadex G-100 matrix. Protocol is economical since the same array can be reused efficiently, at least 30 times to purify ClaveLL.

From the 0-30% fraction were obtained two peaks: the first, clear, corresponding to fractions 7-22 (figure 1) with 64 hemagglutinating activity, is equivalent to ClaveLL, with a purification factor of 13.1 times (Table 1). A total of 8.28 mg ClaveLL is purified from 10 g of *C. verticillaris*. The second peak showed a strong color as well as the fraction, but presented absence of hemagglutinating activity (figure 1).

ClaveLL (1.84 mg mL^{-1}) showed antibacterial activity against all tested species, both gram-positive and gram-negative. The values for MIC and MBC are shown in Table 2. Among the bacteria tested, *Escherichia coli*, gram-negative, had lower MIC ($7.18 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), corresponding to the minimum concentration of lectin required to inhibit bacterial growth visible. However, the minimum bactericidal concentration (MBC) of ClaveLL needed to reduce the number of CFU to 0.1% of initial concentration was $229.9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ for *E. coli*. Minor MBC (57.4 mg mL^{-1}) of ClaveLL was obtained against gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*. Costa *et al.* (2010) studied the leaf lectin of *Phthirusa pyrifolia* (PpyLL) and found MBC of approximately 10 times higher ($500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) than ClaveLL for *B. subtilis*. Instead, Sá *et al.* (2009) found MIC of $2.34 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of the *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin for these same bacteria, corresponding to a concentration 10 times lower than that of ClaveLL ($28 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

This increased activity of ClaveLL against gram-positive bacteria can be explained by increased interaction between the lectin and peptidoglycane thick of wall cell gram-positive bacteria (Costa *et al.*, 2010), as the newly isolated lectin from seeds of *Archidendron jiringa* which showed strong activity against gram-positive *S. aureus* and *B. subtilis* (Charungchitrak *et al.*, 2011). Several types of antimicrobial peptides have been isolated and their structures characterized. Some are toxic to both gram-positive and gram-negative bacteria as well as for fungi, with potential to combat diseases caused by pathogens that are becoming increasingly resistant to traditional

antibiotics. These different types of antimicrobial peptides isolated from plants and animals are evolved as weapons against a specific group of agents of infectious diseases (Zasloff, 2002).

Although several lectins purified from various natural sources have shown antibacterial activity (Takahashi *et al.*, 2008; Riera *et al.*, 2003; Kaws *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2010), its mechanism of action was not elucidated in detail. But has been proposed that proteins with antibacterial activity form a channel in the cell membrane and the cell dies as result of output of cell content (Talas-Ogras *et al.*, 2005).

ClaveLL, with 64 hemagglutinating activity, showed antifungal activity against *F. oxysporum* (14.3%) and *T. rubrum* (35.3%) (figures 2 and 3), results significantly different ($p < 0.05$) of the negative control (PBS) according to the Student *t*-test. However 170 μ g of ClaveLL was not able to inhibit the growth of *F. lateritium* and caused minor inhibition (with no significant differences relation to negative control) of the *F. solani* (7.1%), *T. mentagrophytes* (10%), *M. gypseum* (10%), and *T. asahi* (21.4%) growth (figures 2 and 3). Sitohy *et al.* (2007) found that a lectin isolated from seeds of *Pisum sativum* was also able to inhibit the growth of *F. oxysporum*, with an inhibition zone of 20% using 1mg/mL concentration. Likewise, Yan *et al.* (2005), using 100 μ g of lectin from *Astragalus mongholicus*, and Vaz *et al.* (2010) testing a lectin isolated of *Sebastiania jacobinensis* found the antifungal activity against the same fungus.

Damico *et al.* (2003) related that antifungal activity of lectins are presented with the property that they have to bind to carbohydrates such as chitin, a large polymer of N-acetyl-glucosamine, a component of fungal cell wall. This interaction chitin-binding lectin can lead to rupture the cell wall of fungi (Yun *et al.*, 1998). Thus, many lectins that have specificity for N-acetyl-glucosamine, like ClaveLL, have shown antifungal activity (Fakhoury and Woloshuk, 2001; Yao *et al.*, 2010).

The fraction obtained from the lichen *C. verticillaris* by salt fractionation with 30% ammonium sulphate, was the sample that showed the highest antifungal activity (figure 4 B), with a growth inhibition of *F. solani* (42.9%), *F. oxysporum* (31.4%), *T. mentagrophytes* (37.5%), *M. gypseum* (42.5%), *T. rubrum* (38.2%) and *T. cutaneum* (25%), percentages significantly different ($p < 0.05$) relation to negative control (PBS) according to the Student *t*-test.

The extract (figure 4 A) was more active in inhibiting the growth of *T. mentagrophytes* (35%), fungus that is not inhibited by ClaveLL. Perry *et al.* (1999), studying the antimicrobial activity of 69 species of lichens from New Zealand found that *Cladonia fimbriata* extract also inhibited the growth of *T. mentagrophytes*. Falcon *et al.* (2004), other hand, have found that organic extracts of the lichen *Ramalina solediosa* were inactive against fungi *Microsporon canis*, *M. gypsi*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* and *T. rubrum*.

4. Conclusion

The lectin purified from the lichen *C. verticillaris* showed good antibacterial activity, particularly against gram-positive bacteria, and was able to inhibit the growth of the dermatophyte fungus *T. rubrum*. The antifungal activity observed for extract and fraction from the lichen *C. verticillaris* encourage further studies with isolated compounds with the aim of determine the chemical constituents responsible for such activity.

The results indicate the potential of ClaveLL and other preparations obtained from *C. verticillaris* as antimicrobial agents useful for biotechnological applications with a focus on human health.

5. References

- Ahti, T., Stenroos, S. and Xavier Filho, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraiba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Tropical Bryology* , v. 7 p. 55-70, 1993.
- Athamna, A., Cohen, D., Athamna, M., Ofek, I., Stavri, H. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.
- Burkholder, P.R., Evans, A.W., Mcveigh, I. and Thornton, H.K. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* v. 30, n. 9, p. 250-255, 1944.

Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., Karnchanatat, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. Food Chemistry, v. 126, p.1025–1032, 2011.

Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: SIDDIQUE, Y.H. (Org.). Recent Trends in Toxicology, v. 37, p. 47-59, 2008.

Costa, R.M.P.B., Vaz, A.F.M., Oliva, M.L.V., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Carneiro-da-Cunha, M.G.. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. Process Biochemistry, v. 45, n. 4, p. 526-533, 2010.

Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J. L'antibiogramme. MPC Vigot, Paris, 1988.

Cunha, B.A. Antibiotic resistance. Drugs of Today, v. 34, p.691-698, 1998.

Fakhoury, A.M. and Woloshuk, C.P. Mol. Plant Microbe Int, v. 14, p.955, 2001.

Falcão, E. P.S., Silva, N.H., Gusmão, N.B., Ribeiro, S.M., Pereira, Eugênia. C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. Acta Bot. Brás, v.18, n.4, p. 911-918, 2004.

Girmenia, C., Pagano, L., Martino, B., D'Antonio, D., Fanci, R., Specchia, G., Melillo, L., Buelli, M., Pizzarelli, G., Venditti, M., Martino, P. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. J. Clin. Microbiol, v. 43, p. 1818-1828, 2005.

Kawsar, S.M. A., Mamu, S M. A., Rahman, M. S., Yasumitsu, H., Ozeki, Y. In Vitro Antibacterial and Antifungal Effects of a 30 kDa D-Galactoside-Specific Lectin from the Demosponge, *Halichondria okadai* International Journal of Biological and Life Sciences v. 7, n.1, 2011.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. Dictionary of the Fungi, Tenth ed. CAB International, Oxon, 2008.

Lowry, O.H, Rosebrough N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, p. 265–75, 1951.

Oliveira, M.D.L., Andrade, C.A.S., Santos-Magalhaes, N.S., Coelho, L.C.B.B., Teixeira, J.A., Carneiro-da-Cunha, M.G. and Correia, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. Letters in Applied Microbiology, v.46, p. 371–376, 2008.

Perry, N. B., Benn, M. H., Brennan, N. J., Burgess E. J., Ellis, G., Galloway, D. J., Lorimer, S. D., and Tangney R. S. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. Lichenologist, v. 31, p. 627-636, 1999.

Riera, A.Á., Daud, A., Gallo, A., Genta, S., Aybar, M. AND Sánchez, S. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. BIOCELL, v. 27, n 1, p. 37-46, 2003.

Sá, R.A., Santos, N.D.L., Da Silva, C.S.B., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Cavada, B.S., Coelho, L.C.B.B., NAVARRO, D.M.A. F., BIEBER, L.W., PAIVA, P.M.G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v. 149 p. 300–306, 2009.

Sadik, O.A., Yan, F. Anal Chim. Acta v. 588, p. 292, 2007.

Santos, M.O. Atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória do extrato bruto e do ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (líquen). 82f. Dissertação (Curso de Mestrado em Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

Santos, N.P., Pereira, E.C., Lima, R.M.C., Honda, N.K., Silva, N.H. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (Líquen). Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas v. 1, n.2, p. 23-43, 1997.

Silva, M.D.C., Sá, R.A., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Santos, N.D.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). International Biodeterioration & Biodegradation, v. 63, p. 334-340, 2009.

Sitohy, M., Doheim, M., Badr, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. Food Chemistry, v. 104, p. 971-9, 2007.

Takahashi, K.G., Kuroda, T., Muroga, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila

clam, *Ruditapes philippinarum*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B v.150, p.45–52, 2008.

Talas-Ogras, T., Ipekci, Z., Bajrovic, K. and Gozukirmizi, N. Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. Fitoterapia, v. 76, p. 67–72, 2005.

Vaz, A.F.M., Costa, R.M.P.B., Melo, A.M.M.A., Oliva, M.L.V., Santana, L.A and. Silva-Lucca R.A. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*, Food Chemistry, v.119, n.4, p. 1507–1513, 2010.

Wong, J.H and Ng, T.B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. Peptides, v. 26, p.1120–1126, 2005.

Zasloff, M. Nature, 415:389. 2002

Yan, Q., Jiang, Z., Yang, S., Deng, W., & Han, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 442, p. 72–81, 2005.

Yao, Q., Wu, C.F., Luo, P., Xiang, X.C., Liu, J.J., Mou, L., Bao, J.K. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. Process Biochemistry, v. 45, p. 1477–1485, 2010.

Yilmaz, M., Ozdemir, T.A., Tay, T., Kivac, M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (G⁻)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. Z. Naturforsch, v. 59c, p. 249–254, 2004.

Yun, D.J., Ibeas, J.I., Lee, H., Coca, M.A., Narasimham, M.L., & Uesono, Y. Osmotin a plant antifungal protein subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. Molecular Cell, v. 1, p. 807–817, 1998.

Table 1. Summary of ClaveLL purification.

Sample	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	HA ^a	SHA ^b (HA/mg)	Purification fold ^c
E	430	9,43	512	54,3	*
F₁ (0-30%)	18	40,45	16384	405,04	7,46
ClaveLL	396	0,09	64	711,11	13,1

^aHA: hemagglutinating activity; ^bSHA: specific HA; ^cPurification fold: relation between SHA of crude extract and SHA of lectin.

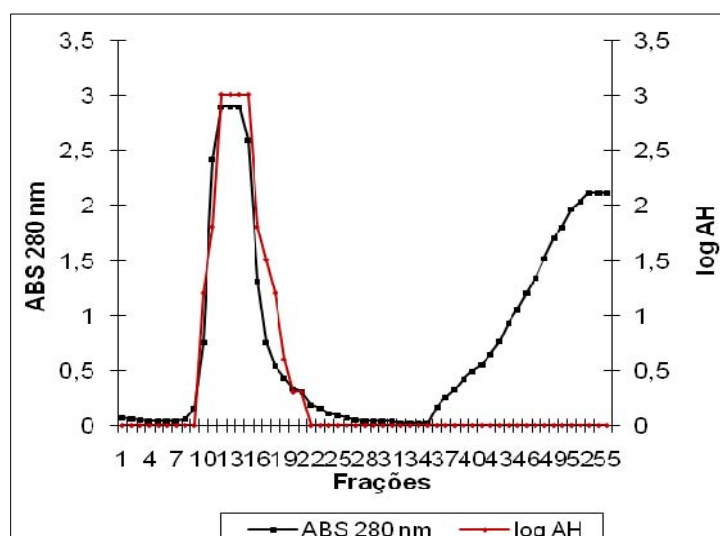


Figure 1. ClaveLL isolated from F₁ through gel filtration chromatography using Sephadex G-100 column (HA in log scale).

Table 2. MIC and MBC of ClaveLL against bacteria species.

<i>Microorganisms</i>	<i>MIC</i> <i>($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>	<i>MBC</i> <i>($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	229.9	459.9
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	28	57.4
<i>Enterococcus faecalis</i> (+)	28	57.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	114.9	919.8
<i>Escherichia coli</i> (-)	7.18	229.9

(+) Gram-positive and (-) gram-negative bacteria. MIC: minimum inhibitory concentration. MBC: minimum bactericidal concentration.

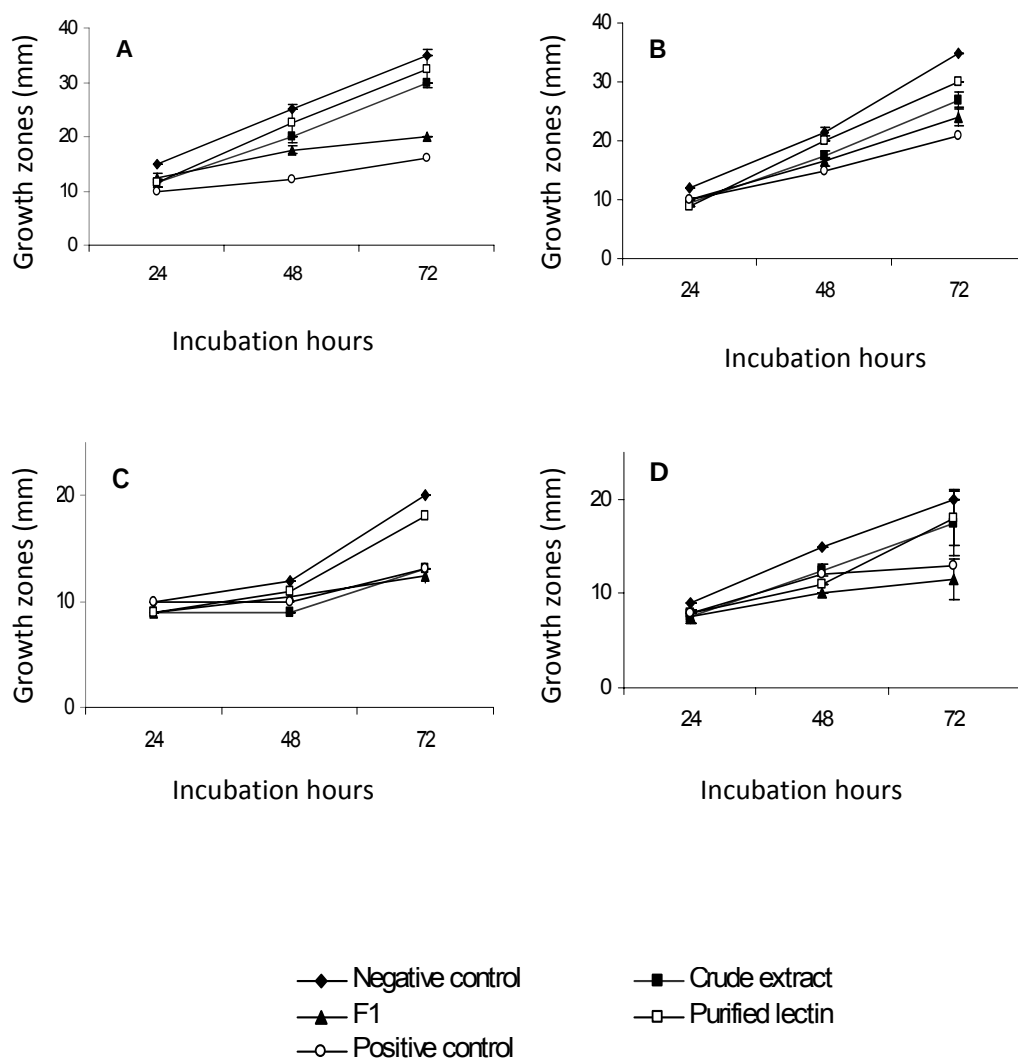


Figure 2: Growth zones (mm) of the fungi *F. solani* (A), *F. oxysporum* (B), *T. mentagrophytes* (C) and *M. gypseum* (D) in PDA medium (Y-axis) throughout the incubation hours (X-axis). Each point represents the mean $\pm$ SD of three experiments.

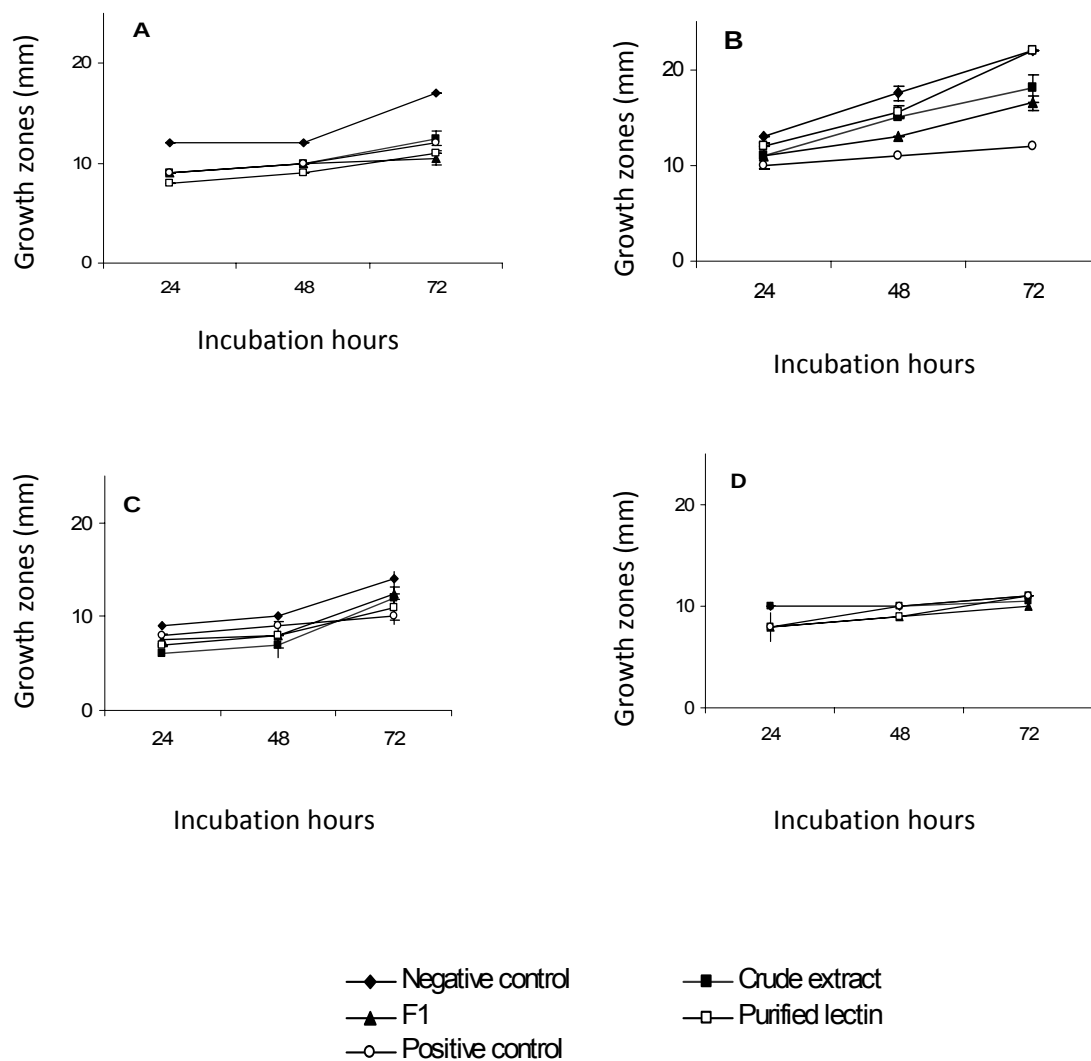


Figure 3: Growth zones (mm) of the fungi *T. rubrum* (A), *T. cutaneum* (B), *T. asahi* (C) and *F. lateritium* (D) in PDA medium (Y-axis) throughout the incubation hours (X-axis). Each point represents the mean $\pm$ SD of three experiments.

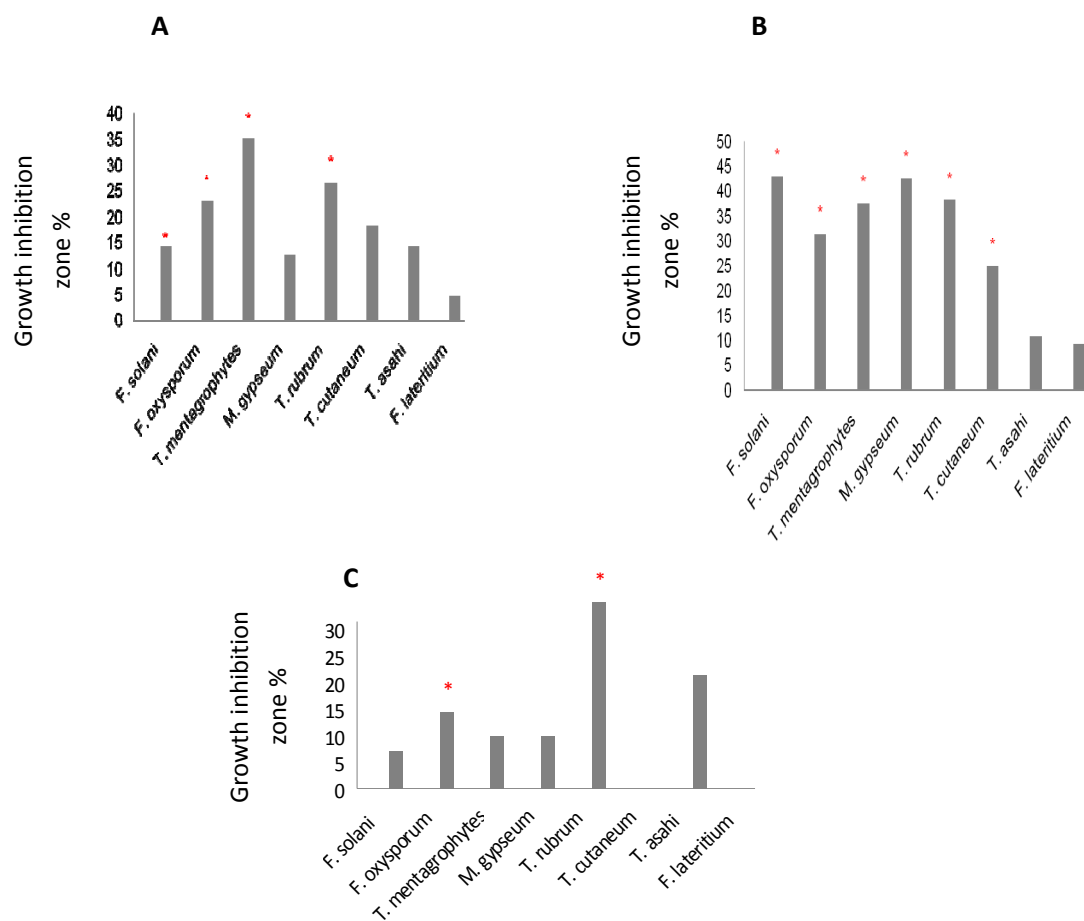


Figure 4 - Antifungal activity of E (A), F_1 (B) and ClaveLL (C), observed as growth inhibition zone % represented on Y-axis. *Difference statistically ($p < 0.05$) significant relation to control.

5. CONCLUSÃO

- ClaveLL é uma lectina purificada através de um protocolo simples e rentável, apresentando maior atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas;
- ClaveLL, apesar de inibir o crescimento de alguns fungos, não foi tão eficiente quando comparada a outras preparações obtidas do líquen *C. verticillaris* (E e F₁), livres de metabólitos secundários, que apresentaram melhor atividade antifúngica contra os dermatófitos testados;
- Novos estudos são necessários para verificar quais substâncias presentes nas preparações de E e F₁ são responsáveis por essa atividade antifúngica;
- ClaveLL e as preparações de E e F₁ obtidas de *C. verticillaris* possuem potencial como agentes antimicrobianos úteis para aplicações biotecnológicas com enfoque na saúde humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraiba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Bryology** , v. 7, p. 55-70, 1993.

ÁLAMO, L.D.; CEREDA, R.F.; TOSIN, I.; MIRANDA, E.A.; MACHADO, A.M.O.; SADER, H.S. Estudo da sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus coagulase negativa* e caracterização de isolados com sensibilidade diminuída aos glicopeptídeos. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.3, p.24, 1999

ALIZADEH, H.; LEUNG, D. W.M.; COLE, A.L.J. Conidiogenic effects of mannose-binding lectins isolated from cotyledons of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) on *Alternaria alternata* . **Phytochemistry** v. 72, p. 94-99, 2011.

AMBROSIO, A.L.; SANZ, L.; SANCHEZ, E.I.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; CALVETE, J.J. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2.

Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 415, p. 245-50, 2003.

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciênc. agrotec.** vol.32, n.2, p. 456-462, 2008.

ARESCHOU, T.; GORDON, S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. **Contrib Microbiol**, v.15, p. 45–60, 2008.

ATHAMNA, A., COHEN, D., ATHAMNA, M., OFEK, I., STAVRI, H. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.

BATTS, J. E.; CALDER, L. J.; BATTS, B.D. Utilizing stable isotope abundances of lichens to monitor environmental change. **Chemical Geology** v. 204, p. 345–368, 2004.

BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv Drug Deliv Rev** v. 56, p.425–35, 2004.

BOSZCZOWSKI, I.; NICOLETTI, C.; PUCCINI, D.M.; PINHEIRO, M.; SOARES, R.E.; VAN DER HEIJDEN, I.M.; et al. Outbreak of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* infection in a neonatal intensive care unit related to onychomycosis in a health care worker. **Pediatr Infect Dis J**.v.24, p.648-50, 2005.

CAMBUIM, I.I.F.N.; NEVES, R.P.; QUEIROZ, L.A.; MAGALHÃES, O. M. C.; LIMA, D.M.L. *Fusarium lateritium* (NEES) as an agent of fungemia in a patient infected with the human immunodeficiency virus (HIV). **Braz. J. Microbiol.** V.38, n.2 , p. 285-286, 2007.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; Lectins, carbohydrate

recognition molecules: are they toxic? In: SIDDIQUE, Y.H. (Org.). **Recent Trends in Toxicology** . v. 37, p. 47-59, 2008.

COSTA, R.M.P.B.; VAZ A. F.M.; OLIVA ,M. L.V.; COELHO ,L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA , M.G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 526-533, 2010.

CRAPEZ, M. A. C. Bactérias Marinhas em: Pereira, R. C. e Soares-Gomes, A. *Biologia Marinha* (organizadores). Rio de Janeiro: **Interciencia**, 2002

CUNHA, B.A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today**, v.34, p.691-698, 1998.

CUNHA, M. H. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2005

DA SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S.R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 20, n.3, p. 355-360, 2010.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S.U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.46, n.1, p. 23-27, 2010.

DIPERSIO, J.R.; DESHPANDE, L.M; BIEDENBACH, D.J.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.51, p.1-7, 2005.

DOPSON, M.; TAYLOR, R.T.; Toxicity of metal extraction and flotation chemicals to *Sulfolobus metallicus* and chalcopyrite bioleaching, *Hydrometallurgy*, v. 81, p.205–213, 2006.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbes and Infection**, v. 5, p.1213–1219, 2003.

EGLI, T. How to live at very low substrate concentration. **Water Research**, v. 44, p. 4826 - 4837, 2010.

ELIFIO, S.L.; SILVA, M.L.C.C.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; A lectin from the lichenized Basidiomycete *Dictyonema glaratum*. **New Phytologist**, v.148, p.327-34, 2000.

GAOFU, Q.; SHIQING, M.; FAYIN, Z.; ZHINIU, Y.; XIUYUN, Z. In vitro assessment of plant lectins with anti-pinwood nematode activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 40–45, 2008.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.** v. 1. 2010.

GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; MARTINO, B.; D'ANTONIO, D.; FANCI, R.; SPECCHIA, G.; MELILLO, L.; BUELLI, M.; PIZZARELLI, G.; VENDITTI, M.; MARTINO, P. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1818-1828, 2005.

HAIDA K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; INÁCIO, C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq Cienc Saude Unipar** v. 1, p. 185-192, 2007.

HARCUS, Y.;NICOLL, G.; MURRAY, J.; FILBEY, K.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; MAIZELS, R. M. C-type lectins from the nematode parasites *Heligmosomoides polygyrus* and *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasitology International** v. 58, p. 461–470, 2009.

HE, Z.; PENG, Q.; CHEN, J. Biology of Thermophiles. **Scientific Press**, Beijing, p. 234, 2000.

HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases** v. 4, p.239-249, 1998.

IMAMICHI, Y.; YOKOYAMA, Y. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lectin from the jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 156, n. 1, p. 12-18, 2010.

KAWSAR, S.M.A.; MAMU, S. M. A.; RAHMAN, M. S.; YASUMITSU, H.; OZEKI, Y. In Vitro Antibacterial and Antifungal Effects of a 30 kDa D-Galactoside-Specific Lectin from the Demosponge, *Halichondria okadai* **International Journal of Biological and Life Sciences**, v. 7, n.1, 2011.

KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, v. 214, p. 562–575, 2009.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi, Tenth ed.** CAB International, Oxon, 2008.

KURMYSHKINA, O.; RAPOPORT, E.; MOISEEVA, E.; KORCHAGINA, E.; OVCHINNIKOVA, T.; PAZYNINA, G.; BELYANCHIKOV, I.; BOVIN, N. Glycoprobes as a tool for the study of lectins expressed on tumor cells. **Acta histochemica**, v.112, p. 118-126, 2010.

LEGAZ, M.E.E.; VICENTE, C.; ASCASO, C.; PEREIRA, E. C.; XAVIER-FILHO, L. Pygmet analysis of Sun and shade populations o *Cladonia verticillaris*. **Biochem. System. Ecol.** v. 14, n. 6, p 575-582, 1986.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. Sarvier, 4° Ed., New York, 1999.

LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters** v. 287 , p. 1–12, 2010.

LOPPI, S.; PUTORTI, E.; SIGNORINI, C.; FOMMEI, S.; PIRINTSOS, S. A.; DE DOMINICIS, V.; **Acta Oecologic**, v,19, p. 405, 1998.

MARCELLI, M. P. Fungos Liqueenizados. In: XAVIER FILHO, L. et al. **Biologia de Liquens**. 1. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 2006.

MEJÍA E.G.; PRISECARU, V.I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 45, p.425–445, 2005

MOREIRA, B.M.; DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in staphylococci. **Pediatric Clinics of North America**, v. 42, p.619-648, 1995.

MORENO, F.B.M.B.; OLIVEIRA,T.M.; MARTIL, D.E.; VIÇOTI, M.M.; BEZERRA, G.A.; ABREGO, J.R.B.; CAVADA, B.S.; AZEVEDO J.R.W.F. **J. Struct. Biol**, v.161, p.133, 2008.

MOSCATELLI, M.C.; LAGOMARSINO. A.; MARINARI, S.; DE ANGELIS P.; GREGO, S. Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation. **Ecological Indicators**, v. 5, p. 171–179, 2005.

MOTA FILHO, F.O.; PEREIRA, E.C.; LIMA, E.S.; SILVA,N.H.; FIGUEIREDO, R.C.B. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando

Cladonia verticillaris (líquen) como biomonitor. **Quím. Nova**, v.30, n.5 , p. 1072-1076, 2007.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 9-16, 2001.

NAKAHARA, S.; RAZ, A., Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. **Anticancer Agents Med Chem** v.8, p.22–36, 2008.

NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ R. A.; ALBUQUERQUE, A.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA P.M.G. Termiticidal activity of lectins from Myracrodruon urundeuva against Nasutitermes corniger and its mechanisms **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 65 , p. 52-59. 2011.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T.R.; TEIXEIRA.,C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from Canavalia grandiflora seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609–616, 2009.

OLIVEIRA, M.D.L.; ANDRADE, C.A.S.; SANTOS-MAGALHAES, N.S.; COELHO, L.C.B.B.; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin from Eugenia uniflora L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.46 , p. 371–376, 2008.

RAVEN. P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6 ° ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.323-329, 2001.

RIERA, A.Á.; DAUD, A.; GALLO, A.; GENTA, S.; AYBAR, M.; SÁNCHEZ, S. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. **BIOCELL**, v. 27, n 1, p. 37-46, 2003.

SADIK, O.A.; YAN, F. **Anal Chim. Acta**, v. 588 , p. 292, 2007.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S.; **Microbiol. Rev.**, 11, 317, 1993

SANTOS, A. F.; CAVADA, B. S.; ROCHA, B. A. M.; NASCIMENTO, K. S.; SANT'ANA, A.E.G. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v.101, p.794–798, 2010.

SANTOS, A.F.S.; ARGOLO, A.C.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. **Water Res**, v.39, p. 975, 2005.

SANTOS, M.O. Atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória do extrato bruto e do ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (líquen). 82f. Dissertação (Curso de Mestrado em Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

SANTOS, N.P.; PEREIRA, E.C.; LIMA, R.M.C.; HONDA, N.K.; SILVA, N.H. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (Líquen). **Revista da Universidade do Amazonas**, Série Ciências Biológicas v. 1, n.2, p. 23-43, 1997.

SÁ, R.A.; SANTOS, N. D. L.; DA SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA , B. S.; COELHO, L.C. B. B.; NAVARRO, D. M.A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA , P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C v. 149 p. 300–306, 2009.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Appl Environ Microbiol** v. 67, p. 2883–2894, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** v. 14, p.53–62, 2004.

SILVA, M.D.C.; SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.

SILVA, R. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2002.

SILVA, T.B.; RANGEL, E.T. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico do tomilho (*Thymus Vulgaris* L.) in vitro, **Revista eletrônica de farmácia**, v. VII (2),p. 48 – 58, 2010.

SONG, K.; LI, D.; ZHAN, M.; YANG, H.; RUAN, L.; XU, X. Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus* . **Fish & Shellfish Immunology** 28, 596-603, 2010.

TAKAHASHI, K. G.; KURODA, T.; MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* . **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** v.150, p.45–52, 2008.

TALAS-OGRAS, T.; IPEKCI, Z.; BAJROVIC, K.; GOZUKIRMIZI, N. Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 67–72, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2000, vol.33, n.3 , p. 281-301, 2000.

TELLES, F.Q. Infecções por Fungos Filamentosos Invasores. **Prática hospitalar**, n 36, 2004.

WANG, R.; NG, T.B.; LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom Polyporus adusta. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-9, 2003.

WORMALD, M.R; SHARON, N. Carbohydrates and glycoconjugates: progress in non- mammalian glycosylation, glycosyltransferases, invertebrate lectins and carbohydrate-carbohydrate interactions. **Curr Opin Struct Biol**, v.14, p.591-592, 2004.

YANO-MELO, A. M.; SAGGIN JÚNIOR, O.; LIMA FILHO, J.M.; MELO, N.F.; MAIA, L. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, v. 9, p. 129-133, 1999.

YOKOYAMA, W.M.; RILEY, J. K. NK cells and their receptors. **Reprod Biomed**; v. 16, p. 173–91, 2008

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H.; NG, T.B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. **Phytomedicine** v.17, p. 775-781, 2010.

ZINGER-YOSOVICH, K.D.; SUDAKEVITZ, D.; ILUZ, D.; GILBOA-GARBER, N. Analyses of diverse mammals' milk and lactoferrin glycans using five pathogenic bacterial lectins. **Food Chemistry**, v.124 , p. 1335–1342, 2011.