

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA LECTINA DA TESTA DE *Punica granatum* L.**

POLLYANNA MICHELLE DA SILVA

RECIFE
2015

POLLYANNA MICHELLE DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA LECTINA DA TESTA DE *Punica granatum* L.

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

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

Co-orientador:
Prof. Dr. Francis Soares Gomes

RECIFE
2015

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

Silva, Pollyanna Michelle da Silva

Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L. / Pollyana Michelle da Silva. – Recife: O Autor, 2015.

84 f.: il.

Orientadores: Patrícia Maria Guedes da Silva, Francis Soares Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia 2015.

Inclui referências

1. Proteínas 2. Lectinas 3. Plantas medicinais I. Silva, Patrícia Maria Guedes da (orient.) II. Gomes, Francis Soares (coorient.) III. Título.

Pollyanna Michelle da Silva

“Caracterização estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana da lectina da testa de *Punica granatum* L.”

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. Patrícia Maria Guedes Paiva
Presidente

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Data: 27 / 02 / 2015

Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos.
Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos em dar.
Madre Teresa de Calcutá

Dedico

a Deus,
a minha Vó Severina,
a minha mãe Maria
aos meus irmãos,
aos meus sobrinhos,
aos meus tios(as),
primos(as) e
aos meus amigos.
Por todo amor a mim dispensado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, Uno e Trino (Pai, Filho e Espírito Santo) que me amou primeiro e me concedeu o dom da vida. Ele que se faz presença em todos os momentos da minha vida iluminando todas as minhas decisões. Obrigada meu Grande Amigo por ter me concedido saúde, paz, sabedoria, amor, felicidade, alegria, a presença de minha família, meus amigos, e todos aqueles que de alguma forma passaram por minha vida.

A presença maternal de Maria em minha vida, ela que soube dar testemunho de amor e confiança em Deus. Pela intercessão dos Santos e Anjos. Todas essas pessoas espirituais que sempre fizeram parte da minha vida.

A minhas queridas vó Severina e mãe Maria por todos os ensinamentos, carinho, cuidado, cumplicidade, companheirismo, dedicação e apoio durante todos esses anos dedicação... enfim, por todo amor a mim dedicados.

Aos meus avôs. Aos meus irmãos Michelson e Denyse por todo amor, cuidado e auxílio nos momentos de necessidade. Aos meus sobrinhos Miguel e Isabelly que são presentes de Deus para nossa família, nos trouxe mais união, amor, alegria e felicidade.

A todos os meus tios (as) em especial minhas tias Maria José e Maria das Graças por todo amor, carinho, auxílio e cuidado dispensados a mim durante todos esses anos. Agradeço aos meus primos (as) em especial Solluan e Jefferson pela presença e companheirismo, enfim, a todos os meus familiares todos os momentos vividos.

Aos meus eternos amigos do Grupo *Anuncia-me* por todos os momentos maravilhosos partilhados, são anjos sem asas que Deus colocou em minha vida, mesmos distantes estão sempre perto em pensamento. Agradeço a todos pelo carinho, cuidado, companheirismo e por ter cultivado tão bem nossa amizade.

Aos meus amigos da Clínica da Imagem onde partilhei bons momentos, em especial Edjane que em sua simplicidade soube muito bem cultivar nossa amizade, nossos cafés da manhã eram ótimos. E ao meu amigo-irmão João Paulo, nunca esquecerei nossas partilhas, agradeço pelos bons conselhos.

Ao meu grande amigo Pe. Rodney que mesmo tão longe é presença em minha vida.

Aos meus amigos de graduação Gisele, Rafael, Poliana, Daize, Priscila, Taís, Ana Milena, Helinton, Daiana, Tatiana, Ivanildo Neto... pelos bons momentos vividos.

Aos meus novos amigos, que embora eu tenha conhecidos há pouco tempo já sinto imenso carinho por todos. Admiro cada um pelo empenho, companheirismo, dedicação, entusiasmo,

alegria, paciência, auxílio e brincadeiras... Francis, Emmanuel, Thiago, Thamara, Lidiane, Nataly, Mayara, Priscila Marcelino, Larissa, Bernardo, João Neto, Carlos, Kézia, Lívia, Thâmarah, Ana Patrícia, Leonardo, Mariana, Marília, Priscila, Weber, Aline, Rayana, David, Michelly, Leyde, Laysa, Tayana, Ricardo, João... e todos que compartilham comigo bons momentos no Departamento de Bioquímica e no Laboratório Bioquímica de Proteínas agradeço por cada bom dia com sorriso nos lábios.

Aos técnicos Carlos, Maria, João e Roberto por toda ajuda e paciência.

Ao apoio concedido pelo Laboratório Bioquímica de Proteínas, pelo Departamento de Bioquímica e pelo CCB e a todos os técnicos vinculados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de Mestrado.

Aos Professores-amigos Emmanuel e Thiago por todo auxílio, transmissão de conhecimento, paciência e amizade.

De maneira especial agradeço a duas pessoas que acreditaram em mim e estão presentes em cada linha e entrelinha desse trabalho. Meu querido co-orientador Francis que tenho a honra de chamar de amigo foi um presente de Deus ter trabalhado com ele durante essa dissertação, sempre acessível e dedicado, nunca irei esquecer seus ensinamentos. À Professora Patrícia, por ter me acolhido tão bem, e estar sempre acessível nos momentos de dificuldade, tenho a honra de tê-la como orientadora e amiga, nunca irei esquecer o apoio, carinho, amizade e seus ensinamentos. Agradeço por ter me confiado um tão belo trabalho.

RESUMO

Frutos da romãzeira (*Punica granatum* L.) são usados popularmente para tratar infecções causadas por microorganismos. Este trabalho descreve o isolamento da lectina da sarcotesta de *P. granatum* (PgTeL; *P. granatum testa lectin*) através de extração de proteínas utilizando NaCl 0,15 M, fracionamento salino utilizando sulfato de amônio (30 % de saturação) e cromatografia em coluna de quitina. A atividade hemaglutinante (AH) foi monitorada ao longo do processo de purificação utilizando eritrócitos de coelho. A massa molecular de PgTeL nativa foi determinada por cromatografia de gel filtração e o perfil eletroforético em condições desnaturantes foi avaliado em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE). Os efeitos do pH, temperatura e íons sobre a sua AH foram determinados e a atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos de importância médica foi avaliada através da determinação das concentrações mínima inibitória (CMI), mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF). Ainda, foi avaliado o efeito de PgTeL na capacidade de aderência e invasiva de bactérias em células HeLa. Tratamento do extrato que apresentou HA específica (18,3) da sarcotesta com sulfato de amônio resultou na precipitação de contaminantes proteicos, uma vez que a fração sobrenadante (FS 30%) apresentou maior AH específica (782) que a fração de proteínas precipitadas (13,92). O perfil da cromatografia de FS 30% em coluna de quitina apresentou um único pico proteico adsorvido, que foi eluído com ácido acético 1,0 M e, após diálise, aglutinou eritrócitos, correspondendo a PgTeL (AH específica: 19.430). A massa molecular relativa de PgTeL nativa em cromatografia de gel filtração foi 58 kDa. Em SDS-PAGE, PgTeL apresentou uma única banda polipeptídica de 58 kDa, indicando que sua estrutura não é formada por subunidades unidas por ligações não-covalentes. A AH de PgTeL foi detectada em valores de pH de 5,0 a 8,0 e foi resistente ao aquecimento até 100°C durante 30 minutos. A AH de PgTeL foi estimulada por Ca^{2+} (10 mM) e Mg^{2+} (20 mM). PgTeL foi agente bacteriostático e bactericida contra *Aeromonas sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus mutans* (valores de CMI variando de 0,27 a 9,0 $\mu\text{g/mL}$ e CMB de 0,27 a 68,4 $\mu\text{g/mL}$), enquanto apenas inibiu o crescimento de *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (valores de CMI variando de 16 a 20 $\mu\text{g/mL}$). PgTeL também inibiu a capacidade de aderência de *S. enteritidis* (40% de inibição) e a capacidade invasiva de *E. coli* e *S. aureus* (59% e 25% de inibição respectivamente) em células HeLa. PgTeL mostrou atividade antifúngica contra espécies de *Candida* (com CMI variando de 6,25 a 25 $\mu\text{g/mL}$ e CMF variando de 6,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$). Em conclusão, PgTeL é uma lectina ligadora de quitina, termoestável, ativa em ampla faixa de pH e com ação antibacteriana e antifúngica, bem como é capaz de interferir na aderência e capacidade invasiva bacteriana.

Palavras-chave: agente antimicrobiano; proteína hemaglutinante; planta medicinal; romã.

ABSTRACT

Fruits of pomegranate (*Punica granatum* L.) are used by people to treat infections caused by microorganisms. This work reports the isolation of a lectin from *P. granatum* sarcotesta (PgTeL) by protein extraction using 0.15 M NaCl, saline fractionation using ammonium sulfate (30% saturation) and chromatography on chitin column. Hemagglutinating activity (HA) was monitored during the purification process using rabbit erythrocytes. The molecular mass of native PgTeL was determined by gel filtration chromatography and the electrophoretic profile under denaturing conditions was evaluated using polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE). The effects of pH, temperature and ions on its HA were determined and the antimicrobial activity against bacteria and fungi with medical importance was evaluated by determination of minimal bactericide (MBC), inhibitory (MIC) and fungicide (MFC) concentrations. In addition, it was evaluated the effect of PgTeL on the adherence and invasive abilities of bacteria on HeLa cells. Treatment of the sarcotesta extract which showed specific HA (18.3) with ammonium sulphate resulted in precipitation of proteic contaminants since the supernatant fraction (SF 30%) showed highest specific HA (782) than the precipitated protein fraction (13.92). Chromatography profile of SF 30% on chitin column showed a single adsorbed protein peak, which was eluted with 1.0 M acetic acid and, after dialysis, agglutinated erythrocytes, corresponding to PgTeL (specific HA: 19.430). The relative molecular mass of native PgTeL on gel filtration chromatography was 58 kDa. In SDS-PAGE, PgTeL appeared as a single polypeptide band with 58 kDa, indicating that its structure is not composed by subunits linked by non-covalent interactions. The HA of PgTeL was detected at pH values from 5.0 to 8.0 and was resistant to heating at 100°C for 30 minutes. The HA of PgTeL was stimulated by Ca²⁺ (10 mM) and Mg²⁺ (20 mM). PgTeL was bacteriostatic and bactericide agent against *Aeromonas sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Streptococcus mutans* (MIC values ranging from 0.27 to 9.0 µg/mL and MBC from 0.27 to 68.4 µg/mL) while only inhibited the growth of *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (MIC values ranging from 16 to 20 µg/mL). PgTeL also inhibited the adherence ability of *S. enteritidis* (40% inhibition) and invasive ability of *E. coli* and *S. aureus* (59% and 25% inhibition respectively) on HeLa cells. PgTeL showed antifungal activity against *Candida* species (MIC values ranging from 6.25 to 25 µg/mL and MFC ranging from 6.25 to 50 µg/mL). In conclusion, PgTeL is a thermostable and chitin-binding lectin, active at a broad pH range, and with antibacterial and antifungal action, as well as is able to interfere with adherence and invasive abilities of bacteria.

Keywords: antimicrobial agent; hemagglutinating protein; medicinal plant; pomegranate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	<i>Punica granatum</i> L. (A) Parte aérea; (B) inflorescência; (C) infrutescência em desenvolvimento; (D) fruto maduro; (E) fruto aberto; (F) sementes envoltas pela sarcotesta. Fonte: Rana <i>et al.</i> (2010).	17
2	Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam ligações não-covalentes. Fonte: Kennedy <i>et al.</i> (1995)	21
3	Aspectos do ensaio de hemaglutinação (A) e inibição da hemaglutinação (B) em placas de microtitulação. Os círculos mostram representações esquemáticas da rede de eritrócitos formada pela lectina (A) e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres (B). Fonte: PAIVA <i>et al.</i> , 2013.	22
 ARTIGO		
1	Chromatography of SF30% (3.9 mg of protein) from sarcotesta extract on chitin column (7.5 x 1.5 cm). The washing step used 0.15 M NaCl and PgTeL was eluted using 1 M acetic acid. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA) and absorbance at 280 nm. (B) SDS-PAGE (12%, w/v) of PgTeL (100 µg) and molecular mass markers stained with silver. (C) Gel filtration chromatography of PgTeL (0.7 mg of protein) on a Hiperp 16/60 Sephacryl S-100 column coupled to a ÄKTA Prime system. Fractions of 2.0 mL were collected and compared with molecular weight markers.	80
2	Inhibition of adherence and invasive capacities of <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Salmonella enteritidis</i> to HeLa cell line after incubation with PgTeL at MIC concentrations.	81

LISTA DE TABELAS

TABELA

PÁGINA

ARTIGO

1	Purification of PgTeL	82
2	Antibacterial activity of PgTeL	83
3	Antifungal activity of PgTeL	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. <i>Punica granatum</i> L.	16
2.2 Lectinas	19
2.2.1. Detecção e Especificidade de lectinas	20
2.2.2. Purificação de Lectinas	23
2.2.3. Características estruturais das lectinas	24
2.2.4. Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas	25
2.2.5. Atividade antimicrobiana de lectinas	28
2.3 Microrganismos	31
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. REFERÊNCIAS	37
5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO Journal of in Applied Microbiology Fator de impacto: 2.386 (JCR-2013)	62
6. CONCLUSÃO	85

1. INTRODUÇÃO

Plantas com valor medicinal, segundo a Organização Mundial de Saúde, (2006) são aquelas que possuem, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica ou substâncias que sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A essas substâncias é dado o nome de princípios ativos (BOCHNER *et al.*, 2012). As plantas têm sido descritas como fontes de medicamentos para os seres humanos desde a Pré-História e é notável o crescente interesse em estudos que avaliam propriedades medicinais de compostos de origem vegetal (ARAÚJO *et al.*, 2011).

O uso de plantas na medicina popular tem grande relevância principalmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade e a eficiência dos serviços de saúde são limitadas. Cerca de 80% da população nesses países utilizam plantas no tratamento de doenças (DURAI PANDIYAN *et al.*, 2006). No entanto, preparações medicinais de origem vegetal podem gerar efeitos adversos, uma vez que as plantas também produzem compostos com efeito tóxico para o organismo humano, seja a curto, médio ou longo prazo. Por isso, faz-se necessária uma análise das atividades biológicas nos extratos de plantas utilizados pela população, a fim de confirmar cientificamente os efeitos benéficos, bem como assegurar a segurança do uso (ALVIANO & ALVIANO, 2009).

Novos agentes antimicrobianos têm sido pesquisados devido aos efeitos colaterais e aos relatos de resistência dos microrganismos decorrentes do uso excessivo e/ou inadequado dos antibióticos atualmente disponíveis (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2011). Nesse contexto, compostos de origem vegetal têm se mostrado boas alternativas.

Usualmente, os compostos de origem vegetal são separados em metabólitos primários e metabólitos secundários (BRAZ-FILHO, 2010). Os metabólitos primários são amplamente distribuídos nos seres vivos, sendo produtos essenciais para o crescimento, desenvolvimento e

reprodução, enquanto os metabólitos secundários são de ocorrência restrita, embora essenciais para os organismos que os produzem por estarem envolvidos nas relações interespecíficas e em mecanismos de defesa (WINK, 2003; WINK, 2011).

Além dos metabólitos secundários, alguns componentes do metabolismo primário das plantas têm sido relacionados a mecanismos de defesa. As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não-imunológica, que ligam especificamente carboidratos de forma reversível, sendo capazes de aglutinar células. Podem assumir diferentes papéis biológicos, todavia, não existe uma função universal para todas elas. De maneira abrangente, as lectinas apresentam diversas atividades biológicas e aplicações biotecnológicas como, por exemplo, agentes antimicrobianos contra patógenos (PAIVA *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2014).

A atividade antibacteriana das lectinas geralmente resulta da interação com ácidos teicóicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos presentes na parede celular bacteriana. As lectinas podem formar um canal na parede celular, promovendo a morte bacteriana por extravasamento do conteúdo celular (CORREIA *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2010). O estudo da interferência de lectinas nos processos de aderência e invasão celular por bactérias também tem recebido destaque (RAJA *et al.*, 2011).

A atividade antifúngica de lectinas envolve a interação com a parede celular de hifas acarretando em redução na absorção de nutrientes, assim como interferência no processo de germinação de esporos (PAIVA *et al.*, 2010). Tem sido sugerido também que lectinas antifúngicas de baixo peso molecular, como heveína (4,7 kDa) e pouteína (14 kDa), podem penetrar a parede celular fúngica e bloquear o sítio ativo de enzimas envolvidas na morfogênese dessa estrutura (VAN PARIJS *et al.*, 1991; BOLETI *et al.*, 2007).

Punica granatum L. (romãzeira) é uma planta bastante utilizada na medicina popular contra diversos tipos de doenças. Extratos dos diversos tecidos da planta apresentam atividades antimicrobiana, hipoglicêmica, antioxidante, estrogênica, anti-neoplásica e

antiinflamatória, bem como aplicações clínicas na Odontologia e no tratamento de doenças como Alzheimer, obesidade, infertilidade, hipertensão, hiperlipidemia e aterosclerose (JURENKA, 2008; WERKMAN *et al.*, 2008). Na medicina popular, folha, casca e fruto são utilizados no tratamento de infecções de garganta, rouquidão e febre, processos inflamatórios da mucosa oral e contra herpes genital. O suco de romã é recomendado para o tratamento de hanseníase, bem como possui atividade hipotensiva, ação protetora contra doenças cardiovasculares e ação antimicrobiana (MATOS *et al.*, 2002; JURENKA, 2008; LANTZOURAKI *et al.*, 2015). A infusão da casca é empregada no tratamento de aftas, diarreia, estomatite e utilizado como adstringente, germicida e antisséptico bucal (DELL'AGLI *et al.*, 2013; ORAK *et al.*, 2011). Além disso, possui ação antiparasitária contra *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* sendo utilizada no tratamento da malária (DELL'AGLI *et al.*, 2009; DELL'AGLI *et al.*, 2010). As flores de *P. granatum* são usadas no tratamento de bronquite, diarreia, disenteria, úlceras, lesão hepática, inflamação nos olhos e diabetes (BAGRI *et al.*, 2010).

A presente dissertação descreve a purificação de uma lectina (PgTeL: *P. granatum testa lectin*) a partir da sarcotesta das sementes de *P. granatum* e a avaliação dos efeitos dessa lectina no crescimento e sobrevivência de bactérias e fungos de importância médica, bem como na capacidade de aderência e invasividade de bactérias.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Punica granatum* L.

A família Lythraceae pertence à ordem Myrtales, segundo a APG II (2003), e possui distribuição pantropical, com algumas espécies nativas de regiões temperadas. Compreende aproximadamente 30 gêneros e 600 espécies. No Brasil, ocorrem 10 gêneros e cerca de 150 espécies, sendo plantas lenhosas, árvores pequenas ou de grande porte, subarbustos, arbustos e, também, ervas anuais (BARROSO, 1991; SCHULTZ, 1985).

As plantas da família Lythraceae possuem folhas simples, opostas e, com menor frequência, alternas ou verticiladas. Possuem uma inflorescência racemosa, com flores vistosas, bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, diclamídias ou raramente monoclamídias. Diversas espécies são cultivadas no Brasil, como a romãzeira (*Punica granatum* L.)

P. granatum é uma espécie nativa da região norte da Índia, mas atualmente é cultivada em vários países como Brasil, Argentina, Chile, Estados Unidos e África do Sul (HAGHAYEGHI *et al.*, 2013; TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2013). É uma planta caducifólia, sendo uma excelente árvore para o cultivo em zona árida por sua resistência a condições de seca. Tolerar ainda solos alcalinos, o calor do verão ou temperaturas mínimas de inverno a 12°C negativos (MENEZES *et al.*, 2008). As plantas maduras têm geralmente de 6 a 12 metros de altura. Tem folhas simples e flores isoladas, de corola vermelha alaranjada e cálices esverdeados, duros e coriáceos (APG II, 2003; ZAGO *et al.*, 2009).

A romã é uma infrutescência (Figura 1) conhecida em alguns países por fruto do Éden por possuir sabor agradável e proporcionar vários benefícios à saúde (AKHTAR *et al.*, 2015). É um fruto do tipo baga, redondo, de casca coriácea, amarela ou avermelhada, contendo inúmeras sementes, com sabor doce, levemente acidulado (MENEZES *et al.*, 2008). A romã

apresenta um pericarpo carnosos-coriáceo e é dividida internamente em muitas lojas, contendo diversas sementes. A testa (tecido originado do óvulo) é formada por células polposas e é dividida em uma mesotesta esclerótica e uma sarcotesta translúcida (parte mais externa), a qual envolve as sementes. A sarcotesta apresenta coloração róseo-avermelhada, é comestível e pode ser removida física, química ou mecanicamente (LOPES *et al.*, 2001).

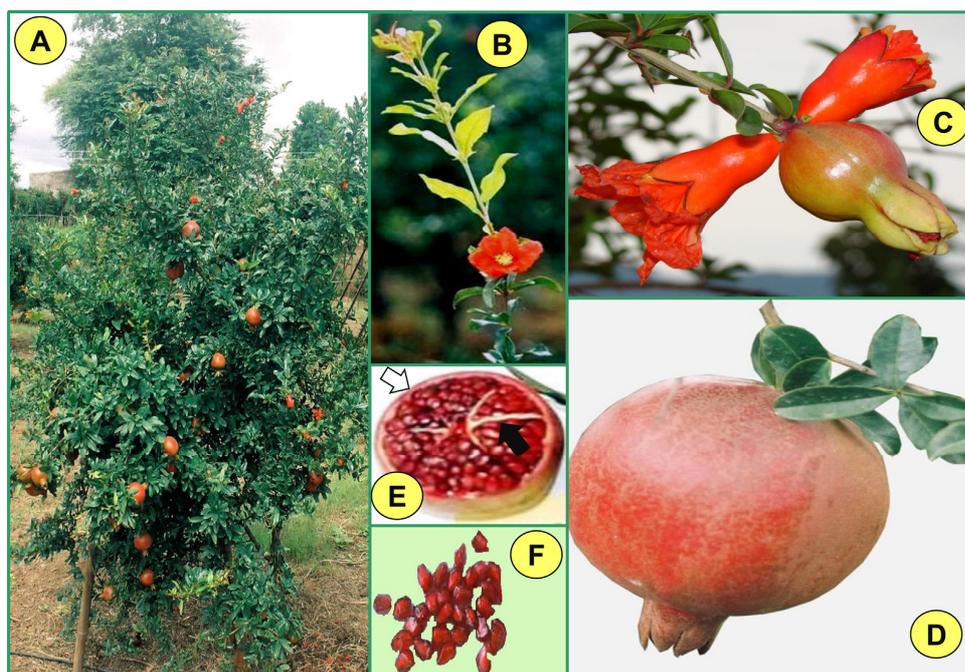


Figura 1. *Punica granatum* L. (A) Parte aérea; (B) inflorescência; (C) infrutescência em desenvolvimento; (D) fruto maduro; (E) fruto aberto; (F) sementes envoltas pela sarcotesta. Fonte: Rana *et al.* (2010).

Pesquisas têm demonstrado que diferentes partes de *P. granatum* constituem um reservatório de compostos bioativos o que justifica seu uso tão amplo na medicina popular. Estudos comprovam efeitos terapêuticos encontrados em extratos, bem como em moléculas isoladas de praticamente todos os tecidos da planta (BEKIR *et al.*, 2013). Nos últimos anos, tem sido mostrada a importância dos alimentos funcionais de origem vegetal por seus vários benefícios à saúde. O suco de *P. granatum* está incluído na lista desses alimentos devido às propriedades terapêuticas de extratos e compostos isolados de praticamente todos os tecidos

(AL-MAIMAN *et al.*, 2002.) Ainda, a casca pode ser empregada na conservação de alimentos (NUAMSETTI *et al.*, 2012).

Extratos metanólico e aquoso de casca de romã apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e antifúngica contra *Aspergillus parasiticus* (AL-ZOREKY *et al.*, 2009; ORAK *et al.*, 2011) e contra patógenos orais causadores da cárie, estomatites e doenças periodontais (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011). Compostos fenólicos isolados da casca exibiram propriedades antimutagênica, antioxidante, apoptótica e antimicrobiana (AKHTAR *et al.*, 2015). Punicalina, um metabólito secundário da classe dos taninos extraído da casca de romã, foi purificado por cromatografia de contracorrente de alta velocidade (HSCCC) e cromatografia líquida de pressão média (MPLC) e apresentou um forte potencial antioxidante (ZHOU *et al.*, 2010). Punicalagina, outro composto fenólico encontrado na casca de romã, apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e fungos dermatófitos (BURAPADAJA *et al.*, 1995; FOSS *et al.*, 2014).

Extratos de folhas foram eficientes no combate a dislipidemia decorrente da obesidade (LEI *et al.*, 2007), bem como possuem ação antiparasitária e antimicrobiana (EGHAREVBA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013). Extratos metanólico e etanólico de folhas possuem compostos com atividade antioxidante, antiinflamatória, anticolinesterase e antiproliferativa (BEKIR *et al.*, 2013).

Extrato etanólico de sementes apresentou atividade antioxidante e antiproliferativa (LUCCI *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no consumo mundial do suco da romã devido aos potenciais benefícios à saúde que lhe são atribuídos. Esses benefícios são atribuídos a antocianinas e outros compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidante maior que o vinho tinto e o chá verde (GIL *et al.*, 2000; QU *et al.*, 2012; VIUDA-MARTOS

et al., 2010). Ainda, o suco apresenta atividades antiinflamatória, antiateroesclerótica e antimicrobiana (VILADOMIU *et al.*, 2013; HAMOUD *et al.*, 2014; LANTZOURAKI *et al.*, 2015).

A luteína, ácido gálico e ácido púnico, compostos isolados do suco de romã exibiram propriedade antimetástica no tratamento de câncer de próstata, interferindo em vários processos ligados ao desenvolvimento de metástase, tais como crescimento celular, adesão celular, migração celular e quimiotaxia (WANG *et al.*, 2012). Compostos fenólicos purificados do suco inibiram a replicação do vírus influenza A responsável por gripe sazonal e a infecção causada pelo enterovírus 71, responsável por doenças neurológicas em crianças (HAIDARI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2012). Extrato, frações e ácido gálico purificado do suco apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias causadoras de diversas doenças em humanos (NAZ *et al.*, 2007) enquanto o extrato hidroalcoólico da fruta apresentou atividade antibacteriana contra bactérias causadoras da placa dentária (JURENKA, 2008). Também foi demonstrada a atividade antibacteriana do suco contra bactérias gram-positivas e gram-negativas transmitidas por alimentos e contra *Helicobacter pylori*, causadora de gastrite crônica e úlcera (HAGHAYEGHI *et al.*, 2013).

2.2. Lectinas

Lectinas constituem um grupo diversificado de proteínas que são caracterizadas por conter pelo menos um domínio não catalítico que lhes permite reconhecer e se ligar seletiva e reversivelmente a carboidratos (SILVA *et al.*, 2014). O primeiro relato sobre lectinas foi feito em 1888 quando Stillmark, ao estudar a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona), observou sua capacidade de aglutinar eritrócitos e a atribuiu à presença de uma proteína, a ricina (KENNEDY *et al.*, 1995). Pouco tempo depois, outra hemaglutinina,

chamada abrina, foi encontrada em sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti). Entretanto, o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960, abrindo uma vasta área de aplicação para as lectinas (GABOR *et al.*, 2004).

O termo *lectina* (originado do latim *lectus*, que significa selecionado) refere-se à habilidade dessas proteínas de ligarem-se seletivamente a carboidratos (PAIVA *et al.*, 2011). Não são produtos de uma resposta imune, o que as difere de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Ainda, os anticorpos são estruturalmente similares, enquanto as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, massa molecular e estrutura tridimensional (PAIVA *et al.*, 2013).

Lectinas estão largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microrganismos (BHOWAL *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2007), invertebrados (BATTISON & SUMMERFIELD, 2009) e vertebrados (NUNES *et al.*, 2011; MANIKANDAN *et al.*, 2012). Nos vegetais, as lectinas têm sido encontradas em cerne (SÁ *et al.*, 2008), folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013), flores (SANTOS *et al.*, 2009), sementes (SILVA *et al.*, 2012), cascas (VAZ *et al.*, 2010), raízes (AGRAWAL *et al.*, 2011) e rizomas (YANG *et al.*, 2011; SANTANA *et al.*, 2012).

2.2.1. Detecção e Especificidade de lectinas

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de interagir por ligações não covalentes (Figura 2) com carboidratos ou glicoproteínas que se apresentam em solução ou ligados à membrana celular (CORREIA *et al.*, 2008).

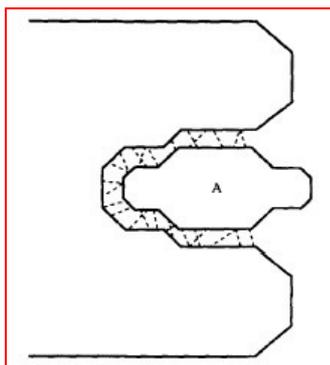


Figura 2. Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam ligações não-covalentes. Fonte: Kennedy *et al.* (1995).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais elas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações reversíveis entre células. As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células. O ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação (Figura 3A), o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina, seguida por posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras), aumentando a sensibilidade das células à lectina, ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído), para fixação dos eritrócitos e possibilidade de armazenamento a maior prazo (COELHO & SILVA, 2000; SANTOS *et al.*, 2005; PAIVA *et al.*, 2010).

Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, uma vez que alguns compostos, tais como taninos, lipídios ou íons bivalentes podem dispersar eritrócitos dando um falso resultado, são necessários ensaios subsequentes de inibição da AH (Figura 3B). No ensaio, é realizada uma diluição seriada da amostra em uma solução contendo carboidratos ou glicoproteínas livres previamente à incubação com eritrócitos. Os sítios de reconhecimento de carboidratos das lectinas serão ocupados pelos carboidratos ou glicoproteínas livres em

solução e não poderão interagir com os açúcares das superfícies celulares, ocorrendo à precipitação dos eritrócitos. Este ensaio determina a especificidade da lectina a carboidratos (PAIVA *et al.*, 2013). É considerado carboidrato específico àquele que resulta na maior inibição da hemaglutinação.

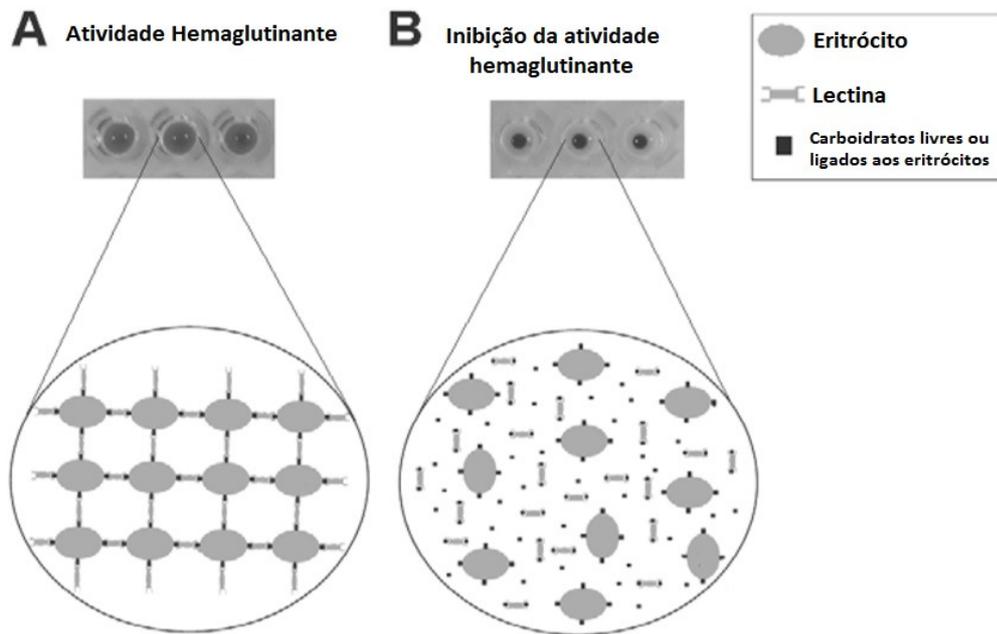


Figura 3. Aspectos do ensaio de hemaglutinação (A) e inibição da hemaglutinação (B) em placas de microtitulação. Os círculos mostram representações esquemáticas da rede de eritrócitos formada pela lectina (A) e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres (B). Fonte: PAIVA *et al.*, 2013.

A grande maioria das lectinas de plantas apresenta dois ou mais sítios de ligação a carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanas), tais como manose, N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico (AMBROSI *et al.*, 2005).

Lectinas podem interagir com todos os tipos sanguíneos ou apresentar especificidade para determinados eritrócitos. A lectina da esponja *Cinachyrella apion* aglutina todos os tipos de eritrócitos humanos (MEDEIROS *et al.*, 2010) enquanto que a lectina da polpa do fruto de

Aegle marmelos é específica para eritrócitos do tipo A (RAJA *et al.*, 2011) e a do cogumelo *Marasmius oreades* é específica para eritrócitos do tipo B (WINTER *et al.*, 2002).

2.2.2. Purificação de Lectinas

Métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas. O primeiro passo para a purificação consiste na extração de proteínas. Extratos podem ser feitos utilizando solução salina, como no caso do isolamento da lectina de rizoma de *Microgramma vacciniifolia* (SANTANA *et al.*, 2012), tampões em diferentes valores de pH, como na obtenção das lectinas de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata*, (OLIVEIRA *et al.*, 2002), dos tubérculos de tupinambo, *Helianthus tuberosus*, (SUSEELAN *et al.*, 2002) e da semente de *Salvia bogotensis* (VEGA & PÉREZ, 2006) ou água destilada, como a obtenção da lectina de sementes de *Moringa oleífera* (SANTOS *et al.*, 2012).

Para a preparação do extrato, o material é lisado ou triturado e mantido sob agitação constante em tempo e temperatura estabelecidos. Este processo resulta no aumento da solubilidade das proteínas do material. A partir do extrato bruto, as proteínas podem ser parcialmente purificadas por precipitarem frente a diferentes condições de saturação salina. O sulfato de amônio, altamente hidrofílico, remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem (NELSON & COX, 2008).

As lectinas parcialmente purificadas pelo fracionamento salino são então submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de massa molecular; as proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra, passam para a solução solvente (THAKUR *et al.*, 2007).

As lectinas podem ser isoladas através de métodos cromatográficos que utilizam matrizes cuja escolha dependerá da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) ou tamanho (cromatografia de gel filtração) da proteína (PAN *et al.*, 2010; QU *et al.*, 2015).

A cromatografia de afinidade, técnica mais amplamente utilizada, tem como princípio de separação a habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos, A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH e/ou força iônica ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). O isolamento das lectinas de casca e cerne de *Myracrodruon urundeuva* foi realizado através de colunas contendo N-acetilglicosamina imobilizada em gel de agarose, sendo eluídas ao se modificar as condições de pH. As mesmas lectinas também podem ser purificadas em colunas de quitina (SÁ *et al.*, 2009).

O isolamento de lectinas é estimulado pela sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, agricultura, indústria farmacêutica, bem como é fundamental para o estudo estrutural e funcional dessa classe de proteínas (LAM *et al.*, 2011; VARROT *et al.*, 2013).

2.2.3. Características estruturais das lectinas

Com base na estrutura geral das proteínas, as lectinas de plantas têm sido subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME *et al.*, 1998). Merolectinas são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação a carboidratos e, por isso, não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas contêm dois ou mais domínios idênticos de ligação a açúcares, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (JIANG *et al.*, 2010). A maioria das lectinas de plantas

pertence a esse grupo. Quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não-relacionado, o qual pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, agindo independentemente dos domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas consistem de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes (VAN DAMME *et al.*, 1996). Portanto, as lectinas apresentam uma grande variedade estrutural, mas uma característica comum a todas é a presença de ao menos um sítio específico de ligação a carboidrato, que corresponde ao chamado domínio de reconhecimento de carboidrato (GABIUS 1994; ZANETTI, 2007).

Algumas lectinas requerem a presença de íons bivalentes para que possam se tornar ativas e prontas para exercerem sua função biológica. Lectinas que não requerem íons metálicos já possuem a conformação estrutural necessária para o reconhecimento de carboidratos (QU *et al.*, 2015). As lectinas, assim como outras proteínas, podem apresentar uma porção glicídica, sendo denominadas de glicoproteínas. Essa porção aumenta a estabilidade da lectina, reduzindo a susceptibilidade à degradação proteolítica e à desnaturação por aquecimento (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012).

2.2.4. Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas

As lectinas, por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos. As lectinas podem, por exemplo, participar no processo de endocitose e mecanismo de transporte intracelular, induzir apoptose em células tumorais, bloquear infecções causadas por microrganismos, regular o processo de adesão e migração de células bacterianas e desempenhar um importante papel no sistema imune por reconhecer carboidratos que são exclusivos de patógenos (DIAS *et al.*, 2015).

Lectinas têm sido utilizadas na detecção e separação de glicoconjugados (PAIVA *et al.*, 2006). A lectina de *Cratylia mollis* (feijão camaratu), quando imobilizada em suporte Sepharose CL-4B, foi utilizada para purificar a enzima lecitina colesterol aciltransferase, importante no metabolismo do colesterol (LIMA *et al.*, 1997) e inibidor de tripsina presente em sementes *Echinodorus paniculatos* (PAIVA *et al.*, 2003). A lectina da casca de *Crataeva tapia*, imobilizada em Sepharose CL-4B, foi capaz de ligar glicoproteínas de interesse comercial (ARAÚJO *et al.*, 2012). Matrizes contendo lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,2,3-Sepharose e Cramoll 3-Sepharose) foram empregadas no isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino, colostro humano, clara de ovo e plasma sanguíneo (NAPOLEÃO *et al.*, 2013).

Lectinas também podem ser utilizadas como drogas antitumorais. As lectinas isoladas de *Rana catesbeiana* e *Abelmoschus esulentus* são proteínas que possuem atividade antitumoral por induzirem morte por apoptose em células mesoteliais malignamente diferenciadas e linhagens de células malignas mamárias (MCF-7), respectivamente (TATSUTA *et al.*, 2014; MONTE *et al.*, 2014). Uma lectina isolada do rizoma de *Microgramma vacciniifolia* apresentou atividade antitumoral sobre células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão e nenhuma citotoxicidade para células mononucleares de sangue periférico humano (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Devido a sua capacidade de reconhecer carboidratos, lectinas têm sido usadas como marcadores histoquímicos para células tumorais, processos inflamatórios e em interações parasita-hospedeiro (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006; MELO-JUNIOR *et al.*, 2008).

Várias lectinas apresentam atividade antiviral, sendo sugerido que a forma de atuação dessas lectinas seja através de ligação com glicoproteínas virais que participam no processo de invasão celular (KOHARUDIN *et al.*, 2011). São exemplos de lectinas com atividade antiviral a jacalina (isolada das sementes de *Artocarpus heterophyllus*), a concanavalina A

(isolada de *Canavalia ensiformis*), a lectina de *Musa acuminata* (banana) e a isolada da raiz de *Myrianthus holstii* que possuem atividade significativa contra vírus envelopados como o HIV (AKKOUH *et al.*, 2015).

A lectina do rizoma de *Setcreasea purpurea* (família Commelinaceae) apresentou atividades antiviral e indutora de apoptose (YAO *et al.*, 2010). Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas (GABOR *et al.*, 2004), essas moléculas têm sido exploradas em sistemas de liberação de drogas. Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca) e a lectina de *Lens culinaris* (lentilha) foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando serem ferramentas potenciais em medicamentos de administração oral com liberação controlada (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Tem sido descrita na literatura que as colectinas, uma família de lectinas encontradas no pulmão de mamíferos, participam na proteção contra alérgenos e patógenos respiratórios, sendo importantes ferramentas no estudo de doenças alérgicas (SALAZAR *et al.*, 2013).

Lectinas ligadoras de manose (MBL) desempenham um importante papel na resposta imune como um receptor padrão de reconhecimento. Vários estudos têm mostrado que as MBL de humanos e galinhas participam na proteção do hospedeiro contra infecções virais como, por exemplo, o vírus da bronquite infecciosa (IBV) que possui grande importância econômica no setor avícola. Estudos demonstraram que MBL desempenham um papel importante na infecção causada por IBV por induzir a produção de anticorpos específicos, o que pode ser explorado como estratégia para otimizar uma vacina contra IBV (KJÆRUP *et al.*, 2014).

Lectina isolada do fruto da jaqueira (*Artocarpus integrifolia*) mostrou efeito imunoestimulante na imunização de camundongos contra neosporose induzindo um efeito

protetor por estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias, revelando seu potencial para formulações de vacina contra *Neospora caninum* (CARDOSO *et al.*, 2011).

Lectinas também podem ser usadas na determinação de tipos sanguíneos por ser um método simples e de baixo custo (KHAN *et al.*, 2002), no diagnóstico de processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (LI *et al.*, 2008) e no tratamento de condições pré-cancerosas como a colite ulcerativa, através de conjugação com drogas (WROBLEWSKI *et al.*, 2001).

Algumas lectinas são capazes de atuar sobre linfócitos, fazendo com que tais células passem de um estado quiescente para um estado de crescimento e proliferação. As lectinas da babosa, *Aloe arborescens*, da semente de *Cratylia mollis* e do cogumelo *Pleurotus ferulae* são alguns exemplos de lectinas com atividade mitogênica (KOIKE *et al.*, 1995; MACIEL *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2014). Uma lectina termoestável isolada de *Aspergillus gorakhpurensis* apresentou potente atividade mitogênica e antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (SINGH *et al.*, 2014).

Lectinas podem atuar como agentes antimicrobianos, como ação contra fungos (RAMOS *et al.*, 2014) e bactérias (SAHA *et al.*, 2014), bem como na identificação de espécies bacterianas por diferença na aglutinação (ATHAMNA *et al.*, 2006) e no estudo de processos de infecção bacteriana e inflamação (HARTMANN & LINDHORST, 2011).

2.2.5. Atividade antimicrobiana de lectinas

O uso de agentes antimicrobianos sintéticos tem levado à seleção de microrganismos cada vez mais resistentes, tornando necessária a busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas (YIM *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2014).

Peptídeos e proteínas com ação antimicrobiana são candidatos promissores para uso como novos agentes antibióticos. As lectinas merecem destaque, uma vez que são capazes de afetar a fisiologia dos microrganismos ao interagir com carboidratos presentes na parede celular de bactérias e fungos, promovendo inibição do crescimento e morte, dentre outros efeitos (GOMES *et al.*, 2014).

A quitina é um polissacarídeo de ocorrência natural composto por monômeros de N-acetilglicosamina. Lectinas ligadoras de quitina têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos. Muitas delas apresentam atividade antifúngica, uma vez que a quitina é o componente-chave da parede celular de fungos (SITOHY *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). A lectina ligadora de quitina do rizoma de *Setcreasea purpurea* foi capaz de inibir a germinação de *Rhizoctonia solani*, *Penicillium italicum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Helminthosporium maydis* (YAO *et al.*, 2010). Gomes *et al.* (2013) isolaram uma lectina ligadora de quitina a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius* com ação fungicida contra *Candida albicans* e Hasan *et al.* (2014) purificaram uma lectina ligadora de quitina de *Solanum tuberosum* com atividade antifúngica contra *Rhizopus spp.*, *Penicillium spp.* e *Aspergillus niger*.

Lectinas isoladas de sementes de plantas leguminosas mostraram atividade antifúngica contra várias leveduras isoladas de secreção vaginal (GOMES *et al.*, 2012). Lectina isolada de raízes secundárias de *Bauhinia monandra* apresentou atividade contra espécies de *Fusarium* (SOUZA *et al.*, 2011) e a lectina isolada do feijão *Phaseolus vulgaris* inibiu o crescimento micelial de *Valsa mali*, fungo causador de tumores em macieiras e pereiras (ANG *et al.*, 2014).

Lectinas de plantas com potencial antifúngico tem sido expressas por técnicas de recombinação gênica. Lectina recombinante de *Aleuria aurantia* expressa em *Escherichia coli* mostrou atividade contra *Mucor racemosus* (AMANO *et al.*, 2012.). A produção de lectinas

recombinantes tem sido vantajosa por obter a proteína em grandes quantidades (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Apesar do pouco conhecimento a cerca do mecanismo de ação antifúngico, já foi observado que as lectinas possuem a capacidade de se ligar especificamente a hifas fúngicas, impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo e perturbando a síntese e/ou a deposição de quitina na parede celular (YAO *et al.*, 2010).

O conhecimento do perfil sacarídico na superfície fúngica habilita o uso de lectinas como promissoras sondas celulares que podem servir como carreadores de agentes antifúngicos que utilizam, como alvos específicos, os carboidratos existentes na superfície da célula do microrganismo (LEAL *et al.*, 2007).

A superfície bacteriana é revestida com glicoconjugados tais como glicoproteínas, glicolipídeos, glicosaminoglicanos e proteoglicanos. A expressão dessas moléculas é específica para cada tipo de espécie bacteriana. Esses carboidratos constituem alvos de ligação de lectinas com atividade antibacteriana (PAIVA *et al.*, 2010).

Lectinas antibacterianas já foram isoladas de animais como *Bothrops leucurus* e *Crassostrea hongkongensis* e plantas tais como *Myracrodruon urundeuva*, *Phthirusa pyrifolia*, *Microgramma vacciniifolia* e *Schinus terebinthifolius* (NUNES *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2011; SÁ *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; SANTANA *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que lectinas podem formar poros na parede celular, induzindo a morte bacteriana pelo extravasamento do conteúdo celular (CORREIA *et al.*, 2008).

Sementes de *Lablab purpureus* contêm proteínas com ação antimicrobiana, incluindo uma lectina que apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella typhi* (SAHA *et al.*, 2014). Ferreira *et al.* (2011) descreveram a atividade antibacteriana de uma lectina de sementes de *Moringa oleifera* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Uma lectina

isolada de *Archidendron jiringa* foi capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas possivelmente pela interação da lectina com ácido murâmico, N-acetilmurâmico e carboidratos presentes na parede celular bacteriana (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011).

Paralelamente aos estudos de atividade antimicrobiana, alguns trabalhos demonstram que a habilidade de lectinas em reconhecer especificamente carboidratos permite o emprego dessas proteínas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas (GAO *et al.*, 2010). Athamna *et al.* (2006) analisaram os diferentes padrões de aglutinação de bactérias promovidas por 23 lectinas e mostraram que a interação lectina-bactéria é uma boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium*. Ampuzano *et al.* (2011) desenvolveram uma sonda contendo a lectina concavalina A para detecção e isolamento de *Escherichia coli* com aplicação em diversos setores como: segurança alimentar, diagnóstico médico e avaliação da qualidade de água.

2.3. Microrganismos

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes e pertencentes ao Domínio Bacteria. Sua classificação é feita de acordo com a constituição da parede celular em dois grupos: gram-positivas (+) e gram-negativas (-). As bactérias gram-positivas apresentam em sua parede celular polissacarídeos, ácidos teicóicos e peptidoglicanos, enquanto as gram-negativas apresentam na sua parede celular peptidoglicanos, lipídeos, proteínas e uma membrana adicional rica em lipopolissacarídeos (TRABULSI, 2000).

Dentre as bactérias Gram (+), encontram-se as do gênero *Enterococcus*, que fazem parte da microflora gastrointestinal dos seres humanos. No entanto, podem ultrapassar a barreira mucosa da parede dos órgãos e causar infecções especialmente em pacientes

imunocomprometidos. Podem também ser responsáveis por endocardite e infecções do trato urinário (HORING *et al.*, 2012).

Bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* fazem parte da microbiota normal da pele humana (KOOKEN *et al.*, 2012). No entanto, são os mais comuns microrganismos causadores de infecções superficiais na pele produzindo erupções pruriginosas acompanhadas de coceira intensa; podem causar também infecções invasivas em regiões mais profundas como músculos, vísceras e tecidos ósseos; e ocasionalmente provoca problemas graves, tais como: choque séptico, endocardite, infecção pulmonar e meningite, além de promover intoxicações alimentares ao homem por intermédio da produção de enterotoxinas (SAMPAIO & RIVITTI, 2007; SANTOS *et al.*, 2007; FOSTER *et al.*, 2014). Das cinco espécies conhecidas do gênero *Micrococcus*, *M. luteus* é o único cujo habitat principal é a pele humana (WIESER *et al.*, 2002). Essa espécie também tem sido alvo de pesquisas na área ambiental, por apresentar a capacidade de ligar a metais pesados e converter em resíduos menos tóxicos ao ambiente (PUYEN *et al.* 2012). Das mais de 30 espécies do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são as mais estudadas por se apresentarem com maior incidência em infecções humanas. A espécie *S. aureus* tem uma alta capacidade de formar biofilme bacteriano devido a diversos fatores como, por exemplo, a resistência a alguns antibióticos (PERIASAMY *et al.*, 2012).

O gênero *Streptococcus* é amplamente distribuído na natureza, podendo estar presente na microbiota humana normal, como também estar associado a importantes doenças humanas e são causa de altos índices de morbidade e mortalidade mundial (TRABULSI, 2000; CANTÓN *et al.*, 2007; RICHARDS *et al.*, 2014). Podem causar febre reumática, escarlatina, glomerulonefrite, síndrome do choque tóxico, faringite, impetigo, sepse puerperal (CARAPETIS *et al.*, 2005; RALPH & CARAPETIS, 2013). Várias espécies são responsáveis pela mastite bovina que causa grande perda econômica na indústria de laticínios

(ZADOKS *et al.*, 2011). A espécie *Streptococcus mutans* é o principal agente cariogênico em humanos, aderindo-se às superfícies dos dentes e metabolizando açúcares fermentáveis a ácidos orgânicos que, por sua vez, causam a desmineralização do dente (HAMADA *et al.*, 1984; LOESCHE, 1986; SATO *et al.*, 2003; ZERO *et al.*, 2009).

Dentre as Gram (-), destacam-se as bactérias do gênero *Aeromonas*, responsáveis por infecções alimentares e infecções oportunistas no homem e outros animais. Já foram atribuídos a ela quadros como meningites, artrites, endocardites, colite, osteomielites, colangite, peritonites, infecções cutâneas e oculares. É a principal causa de gastroenterite que pode se manifestar por quadros que vão de amenas diarréias a casos graves de disenteria (ROSSI JÚNIOR *et al.*, 2001; PARKER *et al.*, 2011).

Klebsiella forma colônias grandes e mucóides, sendo encontrada no trato respiratório e nas fezes. Pode causar endofitalmite, infecções metastáticas e no trato urinário e é responsável por uma pequena fração de pneumonias bacterianas, provocando extensa necrose hemorrágica nos pulmões. *Escherichia coli* pode formar colônias lisas, convexas e circulares e faz parte da microbiota normal, mas pode causar infecção do trato urinário, diarreia, meningite e septicemia (JAWETZ *et al.*, 1991; TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; CROXEN *et al.*, 2013).

Salmonella é um gênero de bactérias potencialmente patogênicas que habitam comumente o trato intestinal de animais, tais como aves domésticas e bovinos. São responsáveis por graves intoxicações alimentares, febre tifoide, infecção sanguínea e urinária (DUIJKEREN *et al.*, 2002; FEASEY *et al.*, 2012).

Serratia é um bacilo oportunista amplamente distribuído no ambiente hospitalar é uma das principais causas de infecções nosocomiais, e responsável por diversas doenças incluindo artrite, pneumonia, endocardite, infecções em feridas, no trato urinário e no sistema nervoso central (YEN-MU WU *et al.*, 2013; PRAMANIK *et al.*, 2014).

Os fungos são organismos não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos (fungos filamentosos) entrelaçados e ramificados, conhecida como micélio, ou na forma de leveduras (fungos leveduriformes). Os fungos, em sua maioria, têm sua parede celular constituída por celulose ou quitina (JAWETZ *et al.*, 1991). Esses microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, água, vegetais, animais e detritos em geral (TRABULSI, 2000).

Os fungos do gênero *Candida*, pertencente à família Saccharomycetaceae, são polimorfos, podendo ser oportunistas (que causam doença em indivíduos que se encontram com atividade imunológica comprometida) ou patogênicos (quando estão sempre associados doenças) (NOBRE *et al.*, 2002). São de grande importância médica para o homem por causarem infecções superficiais como doenças de pele e mucosa ou em tecidos mais profundos (VAL & ALMEIDA FILHO, 2001; CROCCO *et al.*, 2004). A forma sistêmica pode alcançar diversos órgãos, causando candidíase pulmonar e endocardite dentre outros, podendo levar os pacientes a óbito (MENEZES *et al.*, 2008).

A maioria das infecções fungicas invasivas são provocadas por espécies de *Candida* tais como: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* e *Candida pelliculosa*. Foi relatado que essas espécies possuem alta capacidade de forma biofilme onde as hifas são incorporada a uma matriz extracelular dificultando a ação de agentes antifúngicos (GIRI & KINDO, 2012; JUNQUEIRA *et al.*, 2012).

A virulência e patogenicidade de *Candida albicans* são atribuídas a diversos fatores como a capacidade de se transformar em uma célula adaptada para invadir os tecidos dos hospedeiros (KUNAMOTO *et al.*, 2005). A capacidade que esse fungo possui em desenvolver formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) está intimamente associada a sua capacidade de causar doenças. Além disso, sugere-se que temperaturas acima de 3 °C e pH maior que 5,5 podem aumentar a formação de hifas (BASTOS, 2008). A elevada versatilidade de *C. albicans*

faz com que essa espécie fúngica seja considerada o patógeno humano mais comum (HOEHAMER *et al.*, 2010).

A aderência e invasão celular são dois importantes fatores que levam à patogênese. Microrganismos têm a habilidade de invadir células e de se replicarem e persistirem em compartimentos internos, secretando enzimas que interferem no funcionamento das células de tecidos humanos (LIU *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2010; TROUILLET *et al.*, 2011). Dessa forma, compostos que afetem os mecanismos de aderência e invasão celular são de grande relevância para o combate de infecções.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Isolar e caracterizar a lectina da sarcotesta de *P. granatum* (PgTeL, *P. granatum testa lectin*) e avaliá-la quanto à atividade antimicrobiana contra espécies patogênicas ao homem.

3.2. Objetivos específicos

- Extrair a lectina da sarcotesta de *P. granatum* (PgTeL);
- Isolar PgTeL por cromatografia em coluna de quitina;
- Caracterizar a lectina por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE);
- Determinar o efeito de carboidratos, glicoproteínas, pH, íons e temperatura na atividade hemaglutinante de PgTeL.
- Avaliar a atividade antibacteriana de PgTeL contra *Aeromonas sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marsecens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus mutans*, através da determinação dos valores de concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB).
- Avaliar a atividade antifúngica de PgTeL contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa* e *Candida tropicalis*, através da determinação dos valores de concentração mínima inibitória (CMI) e fungicida (CMF).
- Avaliar os efeitos de PgTeL sobre as capacidades de adesão e invasão de *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteritidis* em células da linhagem HeLa.

4. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, S. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of punica granatum peel extracts against oral pathogens. J Dent (Tehran), v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.

AGRAWAL, P. *et al.* A. *Mesorhizobium* lipopolysaccharide (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietinum*. Biochimie, v. 93, n. 3, p. 440-449, 2011.

AKHTAR, S. *et al.* Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. Food chemistry, v. 174, p. 417-425, 2015.

AKKOUH, O. *et al.* Lectins with Anti-HIV Activity: A Review. Molecules, v. 20, n. 1, p. 648-668, 2015.

ALBUQUERQUE L. P. *et al.* Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). International Biodeterioration & Biodegradation, v. 75, p. 158-166, 2012.

ALBUQUERQUE, L. P. *et al.* Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. Acta tropica, v. 138, p. 23-27, 2014.

ALBUQUERQUE, L. P. *et al.* Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races. Applied biochemistry and biotechnology, v. 172, n. 2, p. 1098-1105, 2014.

AL-MAIMAN, S. A. & AHMAD, D. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, v. 76, n. 4, p. 437-441, 2002.

ALVIANO, D. S. & ALVIANO, C. S. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 106-121, 2009.

AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (3), 244-248. 2009.

AMANO, K. *et al.* Aleuria aurantia lectin exhibits antifungal activity against *Mucor racemosus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 76, n. 5, p. 967-970, 2012.

AMBROSI, M. *et al.* Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & biomolecular chemistry*, v. 3, n. 9, p. 1593-1608, 2005.

AMPUZANO, S. *et al.* Bacterial isolation by lectin-modified microengines. *Nano letters*, v. 12, n. 1, p. 396-401, 2011.

APG II. The Angiosperm Phylogenetic Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141 (4): 399-436, 2003.

ANG, A. S. W. *et al.* Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese pinto beans with antiproliferative activity towards

nasopharyngeal carcinoma cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 172, n. 2, p. 672-686, 2014.

ARAÚJO, R. M.S. *et al.* Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2011.

ARAÚJO, R. M. S. *et al.* "*Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent." *Plant Science* 183, 20-26, 2012.

ATHAMNA, A. *et al.* Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.

BAGRI, P. *et al.* New flavonoids from *Punica granatum* flowers. *Chemistry of natural compounds*, v. 46, n. 2, p. 201-204, 2010.

BASTOS, M. L. A. Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* e Estudo Químico Biomonitorado de *Piper hayneanum* C.D.C. (Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell.)Bur. (Bignoniaceae). Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia). Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2008.

BARROSO, G. M. *et al.* Sistemática de Angiospermas do Brasil. v. 2. 1. ed. Minas Gerais: Ed. Imprensa Universitária, 1991.

BATTISON, A. L. & SUMMERFIELD, R. L. Isolation and partial characterisation of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 33, p. 198–204, 2009.

BEKIR, J. *et al.* Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 470-475, 2013.

BHOWAL, J. *et al.* Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 1973-1982, 2005.

BOLETI, A.P.A. *et al.* Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 2653–2658, 2007.

BOCHNER, R. *et al.* Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BURAPADAJA, S. & BUNCHOO, A. Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica*, v. 61, n. 04, p. 365-366, 1995.

CANTÓN, R. *et al.* Antibacterial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* isolated from elderly patients: PROTEKT years 1–5 (1999–2004). *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, n. 6, p. 546-550, 2007.

CARAPETIS, J. R. *et al.* The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet infectious diseases*, v. 5, n. 11, p. 685-694, 2005.

CARDOSO, M. R. D *et al.* ArtinM, a d-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. *Vaccine*, v. 29, n. 49, p. 9183-9193, 2011.

CHOI, Jang-Gi *et al.* In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011.

CHARUNGCHITRAK, S. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chemistry*, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.

COELHO, L. C. B. B. & SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis* v. 11, p. 295-300, 2000.

CORREIA, M. T. S. *et al.* Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). *Recent Trends in Toxicology*. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

COSTA, R. M. P. B *et al.* A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 526–533, 2010.

CROCCO, E. I. *et al.* Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíase superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, p. 689-697, 2004.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DELL'AGLI, M. *et al.* Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. *Journal of ethnopharmacology*, v. 125, n. 2, p. 279-285, 2009.

DELL'AGLI, M. *et al.* Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum*) antagonize in vitro the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria. *Malaria journal*, v. 9, n. 1, p. 208, 2010.

DELL'AGLI, M. A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.

DIAS, R. O. *et al.* Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

DUIJKEREN, V. *et al.* Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *Journal Clinical Microbiology*, v. 40, n. 11, p. 3980-3985, 2002.

DURAIKANDIYAN, V. *et al.* Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 6, n. 1, p. 35, 2006.

EGHAREVBA, H.O. *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Punica granatum* L. (fruit bark and leaves). *N. Y. Sci. J.* 3, 91–98, 2010.

FEASEY, N. A. *et al.* Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, v. 379, n. 9835, p. 2489-2499, 2012.

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

FOSS, S. R. *et al.* Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 13, n. 1, p. 32, 2014.

FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

GABIUS, H. J. Non carbohydrate binding partners, domains of animal lectins. *International Journal Biochemistry*. v. 26, p. 469-477, 1994.

GABOR, F. *et al.* The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 56, n.4, p. 459-480, 2004.

GAO, J. *et al.* Screening lectin-binding specificity of bacterium by lectin microarray with gold nanoparticle probes. *Analytical chemistry*, v. 82, n. 22, p. 9240-9247, 2010.

GIL, M. I. *et al.* Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, 2000.

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

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

GOMES, F. S. *et al.* Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. *Advances in Research*, v. 2, p. 250-265, 2014.

HAGHAYEGHI, Koorosh *et al.* Inhibition of Foodborne Pathogens by Pomegranate Juice. *Journal of medicinal food*, v. 16, n. 5, p. 467-470, 2013.

Haidari, M. *et al.* Pomegranate *Punica granatum* purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, v. 16, n. 12, p. 1127-1136, 2009.

Hamada, S. *et al.* Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *Journal of dental research*, v. 63, n. 3, p. 407-411, 1984.

Hartmann, M. & Lindhorst, T. K. The Bacterial Lectin FimH, a Target for Drug Discovery—Carbohydrate Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Bacterial Adhesion. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2011, n. 20-21, p. 3583-3609, 2011.

Hasan, I. *et al.* Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*). *IJBB*, v. 51, p. 142-148, 2014.

He, X. *et al.* A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *Fish & shellfish immunology*, v. 31, n. 6, p. 1247-1250, 2011.

Hoehamer, C.F. *et al.* Changes in the Proteome of *Candida albicans* in Response to Azole, Polyene, and Echinocandin Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 1655–1664, 2010.

Höring, S. *et al.* Lysozyme facilitates adherence of *Enterococcus faecium* to host cells and induction of necrotic cell death. *Microbes and Infection*, v. 14, n. 6, p. 554-562, 2012.

JAWETZ, E. *et al.* Microbiologia Médica. 18^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.

JIANG, Shu-Ye *et al.* Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC evolutionary biology*, v. 10, n. 1, p. 79, 2010.

JUNQUEIRA, J. C. *et al.* Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2, 9, 16, 23-tetrakis (phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers in medical science*, v. 27, n. 6, p. 1205-1212, 2012.

JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review*, v. 13, n. 2, 2008.

KENNEDY, J. F. *et al.* Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219-30, 1995.

KHAN, F. *et al.* Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor*, v. 8, n. 12, p. RA293-RA300, 2002.

KHAN, F. *et al.* Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 457, p. 243–251, 2007.

KJÆRUP, R. M. *et al.* Adjuvant effects of mannose-binding lectin ligands on the immune response to infectious bronchitis vaccine in chickens with high or low serum mannose-binding lectin concentrations. *Immunobiology*, v. 219, n. 4, p. 263-274, 2014.

KOHARUDIN, L. M *et al.* Novel fold and carbohydrate specificity of the potent anti-HIV cyanobacterial lectin from *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 2, p. 1588-1597, 2011.

KOIKE, T. *et al.* A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from “Kidachi Aloe” (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). *The Journal of Biochemistry* v. 118, p. 1205-1210, 1995.

KOOKEN, J. M. *et al.* Characterization of *Micrococcus* strains isolated from indoor air. *Molecular and cellular probes*, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2012.

KUNAMOTO, C. A. & VINCES, M. D. Contribution of hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 1546-1554, 2005.

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

LANTZOURAKI, D. Z. *et al.* Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. *RSC Advances*, v. 5, n. 4, p. 2602-2614, 2015.

LEAL, A. *et al.* Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Programação e resumos, Recife, 2007.

LEI, F. *et al.* Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity*, v. 31, n. 6, p. 1023-1029, 2007.

LI, Y. R. *et al.* A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1780p. 51-57, 2008.

LIU, W. *et al.* Involvement of Src tyrosine kinase in *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells. *FEBS Letters*, v. 584, p. 27–32, 2010.

LIMA, V. L. M. *et al.* Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, v. 33, n. 1, p. 27-32, 1997.

LOESCHE WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, v. 50, p. 353–380, 1986.

LOPES, K. L. *et al.* Comportamento de sementes de romã (*Punica granatum* L.) submetidas à fermentação e secagem. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 369-372, 2001.

LUCCI, P. *et al.* *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: Antioxidant and antiproliferative activities. *Food chemistry*, v. 167, p. 475-483, 2015.

MACIEL, E. V. M. *et al.* Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.

MANIKANDAN, B. & RAMAR, M. Detection and characterization of natural and inducible lectins in human serum. *Results in immunology*, v. 2, p. 132-141, 2012.

MATOS, F. J. A. Descrição das plantas medicinais. In: *Farmácias Vivas*. Fortaleza: Editora UFC, 4^a ed. p. 216-217, 2002.

MELO-JÚNIOR, M. R. *et al.* Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

MELO-JUNIOR, M. R. *et al.* Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *helicobacter pylori*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 238-240, 2008.

MEDEIROS D.S. *et al.* A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 155:211–216, 2010.

MENEZES, S. M. S. *et al.* Atividades biológicas in vitro e in vivo de *Punica granatum* L.(romã). Moreira JR editora. p. 388-391, 2008.

MONTE, L. G. *et al.* Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. *Biotechnology letters*, v. 36, n. 3, p. 461-469, 2014.

NAZ, S. *et al.* Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of food science*, v. 72, n. 9, p. M341-M345, 2007.

NAPOLEÃO, T. H *et al.* Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research*, v. 110, p.609–616. 2012.

NAPOLEÃO, T. H. *et al.* "Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures." *Applied biochemistry and biotechnology* 171.3, 744-755, 2013.

NELSON, D. L. *et al.* *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.

NOBRE, M. O. *et al.* Antifungal drugs for small and large animals. *Ciencia Rural*, v. 32, p.175-184, 2002.

NUAMSETTI, T. *et al.* Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *ScienceAsia*, v. 38, n. 3, p. 319-22, 2012.

NUNES, E.S. *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 159, p. 57–63, 2011.

OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry* v. 61, p. 301-310, 2002.

OLIVEIRA, C. *et al.* Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application—the frutalin case study. *Frontiers in plant science*, v. 5, 2014.

ORAKI, H. H. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L. cv.) peel. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, v. 10, n. 3, 2011.

PAIVA, P. M. G. *et al.* Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource technology*, v. 88, n. 1, p. 75-79, 2003.

PAIVA, P. M. G. *et al.* Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. *Phytochemistry*, v. 67, n. 6, p. 545-552, 2006.

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

PAIVA, P.M.G. *et al.* Plant Compounds With *Aedes Aegyptin* Larvicidal Activity And Other Biological Properties. In: LIONG, M. (Ed.), *Bioprocess Sciences and Technology*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 271-296, 2011.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex Research Center, 2013.

PAN, S. *et al.* Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 133, n. 2, p. 154-164, 2010.

PARKER, J. L. *et al.* *Aeromonas spp.* clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, v. 62, n. 2, p. 109-118, 2011.

PERIASAMY, S. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 4, p. 1281-1286, 2012.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, p. 199 - 228, 1998.

PRAMANIK, A. *et al.* Secretion and activation of the *Serratia marcescens* hemolysin by structurally defined ShIB mutants. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 304, n. 3, p. 351-359, 2014.

PUYEN, Z. M. *et al.* Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. *Bioresource technology*, v. 126, p. 233-237, 2012.

QU, W. *et al.* Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, v. 132, n. 3, p. 1585-1591, 2012.

QU, M. *et al.* Purification of a secreted lectin from *Andrias davidianus* skin and its antibacterial activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 167, p. 140-146, 2015.

RAJA, S. B. *et al.* Isolation and partial characterisation of a novel lectin from *Aegle marmelos* fruit and its effect on adherence and invasion of Shigellae to HT29 cells. *Plos One*. 6: e16231. doi:10.1371/journal.pone.0016231, 2011.

RALPH, A. P. & CARAPETIS, J. R. Group a streptococcal diseases and their global burden. In: *Host-Pathogen Interactions in Streptococcal Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-27. 2013.

RAMOS, D. B. M. *et al.* Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. *Chinese Journal of Biology*, v. 2014, 2014.

RANA, T. S. *et al.* Systematics and taxonomic disposition of the genus *Punica* L. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol., vol. 4, Special Issue 2, pp. 19–25, 2010.

RICHARDS, V. P. *et al.* Phylogenomics and the dynamic genome evolution of the genus *Streptococcus*. *Genome biology and evolution*, v. 6, n. 4, p. 741-753, 2014.

RODRIGUES, J. S. *et al.* Novel core (polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *Journal of Controlled Release*, v. 92, p. 103-112, 2003.

ROSSI JÚNIOR, O. D. *et al.* "Enterotoxigenicity of *Aeromonas* sp. strains isolated from different points in the cattle slaughtering processing line." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53.5: 589-594, 2001.

SÁ, R. A. *et al.* Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration & Biodegradation* v. 62, p. 460–464, 2008.

SÁ, R. A. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science and Technology* v. 43, p. 85-95. 2009.

SALAZAR, F. *et al.* The role of lectins in allergic sensitization and allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 132, n. 1, p. 27-36, 2013.

SAMPAIO, S. A. & RVITTI, E. A. Dermatologia. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 1600p, 2007.

SANTANA, G. M. S. *et al.* Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin Bioelectrochemistry, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. Water Research, v. 39, p. 975–980, 2005.

SANTOS, A. L. M. Avaliação do sistema conservante em formulação com extrato hidroalcolóico de *Schinus terebintifolius* Radi- Anacardiaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Natal, 2007.

SANTOS, A. F. S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochemistry, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, A. F.S. *et al.* "Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acid removal." Environmental technology, 33.1, 69-75, 2012.

SATO, M. *et al.* Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. Phytomedicine, v. 10, n. 5, p. 427-433, 2003.

SAHA, R. K. *et al.* Antibacterial and Antioxidant Activities of a Food Lectin Isolated from the Seeds of *Lablab purpureous*. American Journal of Ethnomedicine, v. 1, n. 1, p. 008-017, 2014.

SCHULTZ, A. *Introdução à botânica sistemática*. Vol II.5 ed. Porto Alegre: UFRGS. 1985.

SILVA, M. C. C. *et al.* Purification, primary structure and potential functions of a novellectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1049–1059, 2012.

SILVA, Helton C. *et al.* BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 203-209, 2014.

SINGH, R. S. *et al.* Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: Application for Mitogenic and Antimicrobial Activity. *PloS one*, v. 9, n. 10, p. e109265, 2014.

SITOHY, M. *et al.* solation and characterization of a lectin with antifungal activity from *Egyptian pisum sativum* seeds. *Food Chemistry*, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SOUZA, J. D. *et al.* A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

SUN, J.N. *et al.* Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathogenic*, v. 6, e1001181, 2010.

SUSEELAN, K. N. *et al.* Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus L.*) tubers. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 407, p. 241-247, 2002.

TATSUTA, T. *et al.* Sialic acid-binding lectin (lectzyme) induces apoptosis to malignant mesothelioma and exerts synergistic antitumor effects with TRAIL. International journal of oncology, v. 44, n. 2, p. 377, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. *et al.* Pomegranate biology and biotechnology: A review. Scientia Horticulturae, v. 160, p. 85-107, 2013.

THAKUR, A. *et al.* Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1770, n. 9, p. 1404-1412, 2007.

TRABULSI, R. Microbiologia. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

TROUILLET, S. *et al.* A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. Journal of Microbiology Methods, v. 86, p. 145–149, 2011.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clinical microbiology reviews, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.

XU, C-J. *et al.* Isolation and characterization of a novel lectin with mitogenic activity from *Pleurotus ferulae*. Pak. J. Pharm. Sci, v. 27, n. 4, p. 983-989, 2014.

VAL, I. C. C. & ALMEIDA FILHO, G. L. Abordagem atual de candidíase vulvovaginal. Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, v 13, p 3-5, 2001.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* The NeuAc(α -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. European Journal of Biochemistry, v. 235, p. 128-137, 1996.

VAN DAMME, E. J. M *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Critical Reviews in Plant Sciences, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. Planta, v. 183, p. 258-264, 1991.

VARROT, A. *et al.* Fungal lectins: structure, function and potential applications. Current opinion in structural biology, v. 23, n. 5, p. 678-685, 2013.

VAZ, A. F. M. *et al.* Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. Food Chemistry., v. 119, p. 1507-1513, 2010.

VEGA, N. & PÉREZ, G. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. Phytochemistry ;67:347-355, 2006.

VILADOMIU, M. *et al.* Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.

VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, n. 6, p. 635-654, 2010.

WANG, L. *et al.* Specific pomegranate juice components as potential inhibitors of prostate cancer metastasis. *Translational oncology*, v. 5, n. 5, p. 344-IN5, 2012.

WANG, Yan *et al.* Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food chemistry*, v. 138, n. 1, p. 437-443, 2013.

WERKMAN, C. *et al.* Aplicações terapêuticas da *Punica granatum L.*(romã). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 10, n. 3, p. 104-111, 2008.

WIESER, M. *et al.* Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 52, n. 2, p. 629-637, 2002.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular genetics perspective. *Phytochemistry*, 64, p. 3–19, 2003.

WINK, M. *Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, v. 40, 2011.

WINTER, H. C. *et al.* The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1,3Gal and Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14996-15001, 2002.

WROBLEWSKI, S. *et al.* Potencial of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymerdrug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. *Journal of Controlled Release*, v. 74, p. 283-293, 2001.

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

YANG, Y. *et al.* Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, v. 20, n. 1, p. 67-70, 2012.

YAO, Q. *et al.* 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.

YEN-MU Wu. *et al.* *Serratia marcescens* meningitis: Epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 46, p. 259-265, 2013.

YIM, N-H. *et al.* Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. *Integrative Medicine Research*, v. 2, n. 1, p. 18-24, 2013.

ZADOKS, R. N. *et al.* Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011.

ZAGO, A. M. *et al.*, Morpho-anatomy of the stem of *Cuphea glutinosa* Cham & Schltdl.(Lythraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 720-726, 2009.

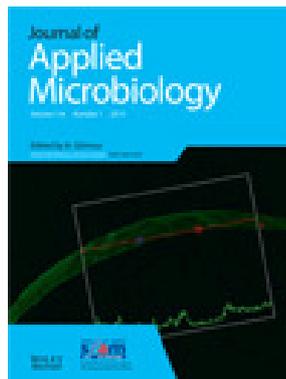
ZANETTI, G. D. Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: Purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas. Tese (Doutorado em Biociências). Instituto de Biociências. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ZERO, D. T. *et al.* The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. *The Journal of the American Dental Association*, v. 140, p. 25S-34S, 2009.

ZHOU, H. *et al.*. Preparative isolation and purification of punicalin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 72, n. 2, p. 225-228, 2010.

5. ARTIGO

**Lectin from sarcotesta of *Punica granatum* L. (pomegranate)
shows antibacterial and antifungal activities**



Artigo a ser submetido para publicação ao periódico:

“Journal of in Applied Microbiology”

Fator de impacto: 2.386 (JCR-2013)

Lectin from sarcotesta of *Punica granatum* L. (pomegranate) shows antibacterial and antifungal activities

Pollyanna Michelle da Silva^a, Emmanuel Viana Pontual^b, Janete Magali de Araújo^c, Thiago Henrique Napoleão^a, Cláudio Gabriel Rodrigues^d, Deborah Tielle de Oliveira Fortes^d, Francis Soares Gomes^e, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Cidade Universitária, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^c*Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^d*Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^e*Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil.*

Running headline: Antimicrobial activity from *Punica granatum* L.

Correspondence

Patrícia M.G. Paiva, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

ABSTRACT

Fruits of pomegranate (*Punica granatum* L.) are used by people to treat infections caused by microorganisms. This work shows that *P. granatum* sarcotesta is source of PgTeL, a lectin with 58 kDa whose hemagglutinating activity is retained in the pH range 5.0-8.0 and after heating to 100°C for 30 minutes. Also, it was reported that PgTeL was bacteriostatic and bactericide agent on *Aeromonas sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Streptococcus mutans* (MIC values ranging from 0.27 to 9.0 µg/mL and MBC from 0.27 to 68.4 µg/mL) while it only inhibited the growth of *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (MIC values ranging from 16 to 20 µg/mL). PgTeL inhibited adherence of *S. enteritidis* (40%) and invasive ability of *E. coli* (59%) and *S. aureus* (25%) on human cancer cell line (HeLa). PgTeL showed antifungal activity against *Candida* species (MIC values ranging from 6.25 to 25 µg/mL and MFC ranging from 6.25 to 50 µg/mL). The toxicity of PgTeL on bacteria and fungi of medical importance and its effect on bacterial adherence and invasiveness indicates the potential application of this lectin as a antimicrobial agent.

Keywords: antimicrobial agent; hemagglutinating protein; medicinal plant; pomegranate.

1. INTRODUCTION

The exposure of human pathogenic microorganisms to antibiotics can naturally result in development of resistance, but the intensive use of these medicines can accelerate this phenomenon. Resistant microorganisms, including bacteria, fungi, viruses and other parasites, are insensitive to the most of standard treatments, which increases the risk of spread of several diseases (World Health Organization, 2012). In this sense, the search for new drugs with potential antimicrobial activity has increased and plant compounds have shown itself an interesting alternative.

Infection by pathogenic strains usually involves multiple components of the cell wall of bacteria and fungi, including carbohydrate-containing molecules that are directly linked to microorganism adherence and may act as virulence factors (Leoff *et al.*, 2008). Compounds that affect the adherence and invasion on epithelial cells have clinical relevance since these processes are involved in the microorganism pathogenesis.

Lectins, hemagglutinating and carbohydrate binding proteins, have shown antibacterial and antifungal activities (Sá *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2013; Albuquerque *et al.*, 2014). The interaction of lectin with molecules from microorganism cell wall such as teichoic acid and peptidoglycan from bacteria and chitin from fungi can result in the inhibition of growth or/and death of microorganism (Paiva *et al.*, 2010). It has been reported that there is a correlation between the ability of lectin to inhibit adherence of bacteria to human cells and lectin specificity to glycan molecules from microorganism cell wall (Graham *et al.*, 1992; Kellens *et al.*, 1994; Raja *et al.*, 2011).

Punica gratatum L. (Lythraceae family) known as pomegranate, is native from Central Asia and it has achieved the title of "superfood" due to its immense potential for health benefits. The plant is used in folk medicine to treat dysentery, vaginal yeast infections, sore

throats, pharyngitis, gingivitis and laryngitis (Bekir *et al.*, 2013; Haghayeghi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). The antibacterial activity of phenolic compounds, pomegranate peel extracts and juice from pomegranate fruits against gram-positive and gram-negative species was already described (Naz *et al.*, 2007; Al-Zoreky *et al.*, 2009; Haghayeghi *et al.*, 2013). Also, extracts of pericarp and peel from pomegranate showed anticandidal activity (Endo *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2010).

This work reports the isolation and structural characteristics of PgTeL, a lectin from *P. granatum* sarcotesta. Also, we determine the antimicrobial activity of PgTeL against bacteria and fungi human pathogenic and its effect on adherence and invasive capacity of *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to human (HeLa) cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and lectin isolation

Punica granatum L. has the vernacular names of romanzeira in Portuguese, Granada in Spanish, and pomegranate in English. The fruits were collected in the State of Pernambuco (08° 04' S 37° 15' W), Brazil. Seeds of *P. granatum* were sieved (mesh of 1 mm) and the sarcotesta (the gelatinous integument) was separated for lectin isolation.

A crude extract was obtained by mixing the sarcotesta (90 mL) with 0.15 M NaCl (10 mL) in a magnetic stirrer (6 h at 4 °C), followed by filtration through gauze and centrifugation (3000 g, 15 min). The clear supernatant resulting from the centrifugation (sarcotesta extract) was treated with ammonium sulphate (30% saturation) as described by Green and Hughes (1955). After stirring (4 h at 4 °C), the mixture was centrifuged (5.000 g, 15 min) and the precipitate (PF30%) and supernatant (SF30%) fractions were collected and dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (1 h).

In order to isolate the lectin of *P. granatum* sarcotesta (PgTeL), SF30% (3 mL; 3.9 mg of protein) was loaded onto a chitin column (7.5 x 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl and eluted with 1 M acetic acid (45 mL). The pool of eluted fractions was dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h) to completely eliminate the eluent solution.

Protein concentration and hemagglutinating assay

The sarcotesta extract, PF30%, SF30% and PgTeL were evaluated for protein content according to Lowry *et al.* (1951) using serum albumin (31.25–500 µg/mL) as standard and for hemagglutinating activity (HA). The HA assay was performed in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Napoleão *et al.* (2012) using a suspension of rabbit erythrocytes (2.5% v/v) previously treated with glutaraldehyde (Bing *et al.*, 1967). One hemmagglutination unit (titer) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that promotes full agglutination of erythrocytes. The specific HA was defined as the ratio between the titer and the protein content (unit/mg).

The HA was also determined after previous incubation (30 min) of PgTeL (0.081 mg/mL) with 200 mM monosaccharide (N-acetylglucosamine, glucose, fructose and galactose) solutions, 0.5 mg/mL glycoprotein (ovoalbumin and fetal bovine serum) solutions and at different pH values (10 mM citrate phosphate buffer, pH 5–7 and 10 mM Tris–HCl, pH 8–11). HA assay was also performed using the lectin heated (30 min) to 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C.

Subunit composition of PgTeL

The subunit composition of PgTeL was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The lectin (100 µg) was applied on a gel containing 12% of acrylamide, prepared according to Laemmli (1970).

PgTeL and molecular mass markers (bovine serum albumin, 66 000; ovalbumin, 45 000; carbonic anhydrase, 29 000; trypsinogen, 24 000; trypsin inhibitor, 20 000 and α -lactalbumin, 14 200; from Sigma, USA) were stained with silver.

Gel filtration chromatography of PgTeL

PgTeL was chromatographed on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 column (16 mm x 60 cm) coupled to an ÄKTA Prime system (GE Healthcare, Sweden) pre-equilibrated at 24 °C with 0.15 M NaCl. The lectin (2.0 mL containing 0.7 mg of protein) was injected and the chromatography was performed with 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions of 2.0 mL were collected. The molecular mass standards phosphorylase b (97000 Da), albumin (66000 Da), ovalbumin (45000 Da), carbonic anhydrase (30000Da), trypsin inhibitor (20100 Da), and α -lactalbumin (14400 Da) were similarly chromatographed.

Antimicrobial activity of PgTeL

Gram-positive (*Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Micrococcus luteus* F00112, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 833, *Streptococcus mutans* ATCC 700610) and Gram-negative (*Aeromonas* sp. ATCC 35941, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella* sp. ATCC 29665, *Salmonella enteritidis* MM 984, *Serratia marcescens* ATCC 13880) strains were provided by the *Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil*.

Stationary cultures were maintained in nutrient agar (NA) and stored at 37°C. To determine the antibacterial activity, bacteria were cultured in nutrient broth (NB) and incubated while shaking at 37°C overnight. Cultures were adjusted turbidimetrically to 1.5×10^8 colony forming units (CFU)/mL at a wavelength of 490 nm.

Aliquots (100 μ L) of PgTeL (0.23 mg/mL) were diluted 1:2 in NB (100 μ L) and submitted to a series of 10 double dilutions to a final ratio of 1:2048. Aliquot (180 μ L) of each dilution was dispensed into a microtitre plate well. All wells were inoculated with 20 μ L of the bacterial culture and incubated at 37°C for 24 h. Assays were performed in triplicate for each concentration. Negative control wells contained NB medium and the microorganisms. After incubation, optical density was measured at 490 nm (OD₄₉₀) using a microplate reader (Biotek Instruments Inc., VT, USA). Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest protein concentration at which there was $\geq 50\%$ reduction in optical density relative to the control well OD₄₉₀ (Amsterdam, 1996). To determine minimal bactericide concentration (MBC), inoculations (10 μ L) from wells treated with PgTeL that was found to inhibit bacterial growth were transferred to NA plates and incubated at 37°C for 24 h. The lowest protein concentration showing no bacterial growth was recorded as the MBC. The assay was performed in triplicate.

Candida genus fungi (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsiloses*, *C. pelliculosa* and *C. tropicalis*) were obtained from the Culture Collections at University Recife Mycologia, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Antifungal activity was evaluated using the same method used for antibacterial activity, changing the incubation temperature (28°C) and replacing the culture medium used. Sabouraud dextrose was used to determine the MIC, while Sabouraud agar was used to determine the minimal fungicide concentration (MFC) defined as the lowest protein concentration showing no fungal growth. Assays were performed in triplicate.

Evaluation of in vitro adherence and invasive capacities

PgTeL was evaluated for effects on adherence and invasive capacities of *E. coli*, *S. aureus* and *S. enteritidis* to human cancer (HeLa) cell line. The assays were performed as

described by Ling *et al.* (2000) with modifications. Semiconfluent cells monolayers were prepared in 24-well culture plates (Costar) using Dulbecco's modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µg/mL of gentamicine. Bacteria culture (1 mL) was turbidimetrically adjusted to 1.5×10^8 CFU per mL and incubated (2 h) with distilled water (1 mL) or PgTeL (1 mL) to a final volume of 2 mL at MIC concentrations. The monolayer was then infected with bacterial cultures and incubated (2 h) with negative control (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2) or PgTeL to reach an adequate infection level. Monolayer infected with mock buffer (sterile PBS) was taken as uninfected control.

To measure adherence, the monolayer was washed three times with PBS after 2-h infection and lysed with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS. Next, appropriate dilutions of the material removed by washing were placed on Mueller Hinton Agar to determine the number of CFU. To measure internalization, the monolayers were washed 3 times after 2-h infection and incubated for another 2 h in the cell culture medium containing gentamicine (200 µg/mL), in order to kill all remaining extracellular bacteria. The monolayer was then washed three times with PBS and treated with 1% (v/v) Triton X-100, and counting of cells in plate was performed as described above. The adherence and invasive capacity rates were calculated from the mean of triplicates performed in three independent experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Plants have been investigated as source of antimicrobial lectins aiming to search new economically viable alternatives for treating human infections. In this work, it was established a procedure for the purification of lectin from *P. granatum* sarcotesta (PgTeL) and determined the antimicrobial activity of it against pathogenic species to human. Table 1 summarizes the

steps for lectin isolation that included preparation of the extract (specific hemagglutinating activity of 18.3), elimination of extract protein without hemagglutinating activity using 30% ammonium sulphate and chromatography on chitin column of supernatant fraction (SF30%). The SF30% was chosen for lectin isolation since it showed specific hemagglutinating activity (782) higher than PF30% (192). Chitin was selected for chromatographic step to be a cheap and efficient support to isolate antimicrobial lectins (Sá *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2013). PgTeL (specific hemagglutinating activity of 19,430) was eluted from chitin column with 1M acetic acid as a single peak (Figure 1A) with a purification factor of 1,061. Evaluation of PgTeL hemagglutinating activity under different conditions revealed that the hemagglutinating activity of the lectin was totally inhibited by ovalbumin and fetal bovine serum and active in the pH range 5.0-8.0 and temperature of 25 to 100°C.

Polyacrylamide gel (10 % w/v) electrophoresis under denaturing conditions revealed PgTeL as a polypeptide of 58 kDa (Figure 1C) and native molecular mass of PgTeL determined by gel filtration chromatography was 58 kDa (Figure 1B). The molecular mass of PgTeL was bigger than antimicrobial lectins isolated from the *Myracrodruon urundeuva* heartwood (14.4 kDa) and from *Schinus terebinthifolus* leaf (14 kDa) (Sá *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2013). On the other hand, molecular mass of the antimicrobial lectin from *Apuleia leiocarpa* seeds (55.8 kDa) was close to that of PgTeL and the antimicrobial lectin from *Indigofera heterantha* seeds was bigger of them, consisting in a tetramer with 70 kDa (Qadir *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015).

PgTeL is active at temperature range which allows the growth of bacteria and fungi (4 to 60°C) and in the pH of oral mucosa (6.78±0.04) (Hill *et al.*, 1995; Aframian *et al.*, 2006). These characteristics and the antimicrobial activity already described for preparations from pomegranate fruits stimulated us to investigate the effect of lectin on growth and survival of bacteria and fungi pathogenic to human.

Table 2 shows that PgTeL was bacteriostatic and bactericide against *Aeromonas. sp.*, *E. faecalis*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. enteritidis*, *S. marcescens*, *S. saprophyticus*, *S. mutans*, showing the best activity against *E. coli* with MIC and MBC of 0.27 µg/mL. Furthermore, the lectin was able to inhibit the growth of *Klebsiella sp.*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, but was not able to kill these bacteria. PgTeL was antibacterial an agent more efficient than the lectin isolated from *Bothrops leucurus* snake venom, that was inactive against *E. coli* and *K. pneumoniae* and bacteriostatic and bactericide against *E. faecalis* and *S. aureus*, with MIC values of 62.5 and 31.5 µg/mL and MBC of 330 and 500 µg/mL, respectively (Nunes *et al.*, 2011). PgTeL was fungistatic and fungicide against *Candida* species however it was antifungal agent more efficient on *C. parapsilosis* with MIC and MFC of 6.25 µg/mL (Table 3).

The property of PgTeL to bind glycoproteins and chitin (N-acetylglucosamine polymer) may be related to its antimicrobial activity through the interaction with N-acetylglucosamine, N-acetylmuramic acid (MurNAc) and tetrapeptides linked to MurNAc present in the cell wall of Gram-positive bacteria, lipopolysaccharide present in the cell walls of Gram-negative bacteria and with the fungal cell wall, which is composed of chitin, glucans and other polymers (Dziarski *et al.*, 2000; Adams, 2004). A chitin-binding and antibacterial lectin isolated from seeds of *Araucaria angustifolia* promotes bubbling of the *Xanthomonas axonopodis* cell wall and formation of pores and disruption of the *Clavibacter michiganensis* membrane (Santi-Gadelha *et al.*, 2006).

Adherence and invasion of epithelial cells lead to the pathogenesis and carbohydrate-containing molecules of the cell wall are directly linked to bacterial adherence acting as virulence factors (Leoff *et al.*, 2008). The effect of PgTeL on adherence and invasive capacity of *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to human (HeLa) cell lines was determined since compounds that affect these processes have clinical relevance.

PgTeL at 0.027 µg/mL promoted reduction (40%) of adherence capacity of *S. enteritidis* as well as the invasion capacity of *E. coli* (59%) and *S. aureus* (25%) but it did not interfere in the invasive capacity of *S. enteritidis* (Figure 2).

Wagner *et al.* (2014) reported that *S. enteritidis* possess the virulence factor SiiE that mediate the adhesion to epithelial cells in a lectin-like manner interacting with glycoconjugates containing N-acetylglucosamine from apical membrane and that SiiE expressing Salmonella bind to chitin. These authors also showed that plant lectins can inhibit the epithelial cell invasion by bacteria. PgTeL is a carbohydrate and chitin-binding lectin and the inhibition of adherence and invasion capacities of bacteria to HeLa cells by PgTeL may be due to binding of lectin to glycoconjugate receptors of HeLa cell resulting in the blockage of interaction between bacterial molecules and human cells.

Several studies have reported that lectins interfere in adherence and invasion of bacteria to host cells. Graham *et al.* (1992) showed that lectin-like proteins (50 µg/mL) from uroepithelial cells inhibited 50% adhesion of *Staphylococcus saprophvticus*, *Lactobacillus sp.* and *Bacteroides intermedius* to uroepithelial cells. Raja *et al.* (2011) demonstrated that the adherence of *Shigella dysenteriae* to human colon tumor cells was inhibited by *Aegle marmelos* fruit lectin at 625 µg/mL and it was suggested that the specificity of lectin to N-acetylgalactosamine, mannose and sialic acid might have played a key role in inhibition.

Interaction of PgTeL with glycoconjugates from *S. enteritidis*, *E. coli* and *S. aureus* also can be responsible for the inhibition of adherence and invasion capacities of them. *E. coli* and *S. aureus* express surface proteins that are covalently attached to peptidoglycan, which are crucial for the process of adhesion and invasion to cell (Tchesnokova *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2014). It has been also reported that plant lectins agglutinated streptococcal bacterial cells which prevented the adherence of them to human cell surfaces (Kellens *et al.*, 1994).

This study revealed that PgTeL is a candidate to be used as a biomaterial with bactericide and fungicide properties for treating infections by its stability to human body temperature and pH, antimicrobial activity on microorganisms human pathogenic and inhibition of bacterial processes involved in pathogenicity of bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (P.M.G. Paiva), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), and *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação* (MCTI) for research grants. E.V. Pontual would also like to thank FACEPE and CAPES for postdoctoral scholarship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Adams, D.J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**, 2029–2035.
- Aframian, D. J., Davidowitz, T., and Benoliel, R. (2006) The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral diseases*, **12**(4), 420-423.
- Albuquerque, L.P., Santana, G. M. S. S., Pontual, E. V., Napoleão, T. H., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G. (2012) Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation*, **75**, 158-166.

- Albuquerque, L. P., Sá Santana, G. M., Napoleão, T. H., Coelho, L. C. B. B., da Silva, M. V., Paiva, P. M. G. (2014). Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2), 1098-1105.
- Al-Zoreky, N. S. (2009) Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, **134** (3), 244-248.
- Amsterdam, D. (1996) Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* ed. Loman, V. pp. 52–111. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Bekir, J., Mars, M., Souchard, J. P., and Bouajila, J. (2013) Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, **55**, 470-475.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., and Stavinsky, A.B. (1967) Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **124**, 1166–1170.
- Carvalho, A. S., Silva, M. V., Gomes, F. S., Paiva, P. M. G., Malafaia, C. B., Silva, T. D., Vaz, A. F. M., Silva, A. G., Arruda, I. R. S., Napoleão, T. H., Carneiro-da-Cunha, M. G., Correia, M. T. S. (2015) Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.001.
- Dziarski, R., Rasenick, M.M. and Gupta, D. (2000) Bacterial peptidoglycan binds to tubulin. *Biochim Biophys Acta* **1524**, 17–26.
- Endo, E. H., Garcia Cortez, D. A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., and Dias Filho, B. P. (2010) Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from

- pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Research in microbiology, **161(7)**, 534-540.
- Ferreira, R. S., Napoleão, T. H., Santos, A. F. S., Sá, R. A., Carneiro-da-Cunha, M. G., Morais, M. M. C., Silva-Lucca, R. A., Oliva, M. L. V., Coelho, L. C. B. B., and Paiva P. M. G. (2011) Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. Letters in applied microbiology, **53**, 186-192.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nature Reviews Microbiology, **12(1)**, 49-62.
- Graham, L. L.; Ceri H.; Costerton J.W. (1992) Lectin-like proteins from uroepithelial cells which inhibit in vitro adherence of three urethral bacterial isolates to uroepithelial cells. Microbial Ecology in Health and Disease **5**, 77-86.
- Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., and Paiva, P.M.G. (2013) Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. Journal of Applied Microbiology, v. 114, p. 672-679.
- Haghighy, K., Shetty, K., and Labbé, R. (2013) Inhibition of Foodborne Pathogens by Pomegranate Juice. *Journal of medicinal food*, **16(5)**, 467-470.
- Hill, C., O'Driscoll, B. and Booth, I. (1995) Acid adaptation and food poisoning microorganisms. Int J Food Microbiol **28**, 245–254.
- Jain, P., and Nafis, G. (2011) Antifungal Activity and Phytochemical Analysis of Aqueous Extracts of *Ricinus communis* and *Punica granatum*. *Journal of Pharmacy Research*, **4(1)**.
- Kellens, J.; Jacobs, J.; Peumans, W.; Stobberingh, E. (1994) Agglutination of "*Streptococcus milleri*" by lectins. Journal of Medical Microbiology **41**, 14-19.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leoff, C.; Saile, E.; Sue, D.; Wilkins, P.; Quinn, C.P.; Carlson, R.W.; Kannenberg, E.L. (2008) Cell wall carbohydrate compositions of strains from the *Bacillus cereus* group of species correlate with phylogenetic relatedness. *Journal of Bacteriology* 190,112-121.
- Ling, S.H.M.; Wang, X.H.; Xie, L.; Lim, T.M.; Leung, K.Y. (2000) Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in in vivo and in vitro fish models. *Microbiology* 146, 7-19.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Napoleão, T. H.; Pontual E.V; Lima T. A.; Santos, N. D. L.; Sá, R. A.; Coelho, L. C. B. B.; Navarro D. M. A. F., and Paiva, P. M. G. (2012) Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research* 110, 609–616.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A., and Sayeed, S. A. (2007) Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 72(9), M341-M345.
- Nunes, E. S., De Souza, M. A. A., Vaz, A. F. D. M., Santana, G. M. D. S., Gomes, F. S., Coelho, L. C. B. B., and Correia, M. T. D. S. (2011) Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(1), 57-63.
- Paiva, P. M. G., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Sá, R. A., Correia, M. T. S., and Coelho, L. C. B. B. (2010) Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 396-406.

- Qadir, S., Wani, I.H., Rafiq, S., Ganie, S. A., Masood, A., Hamid, R. (2013) Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 11, 999-1006.
- Raja, S. B., Murali, M. R., Kumar, N. K., Devaraj, S. N. (2011) Isolation and partial characterisation of a novel lectin from *Aegle marmelos* fruit and its effect on adherence and invasion of *Shigellae* to HT29 cells. *PloS one*, 6(1), e16231.
- Sá, R.A., Gomes, F.S., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Melo, C.M.L., Gusmão, N.B., Coelho, L.C.B.B., and Paiva, P.M.G. (2009) Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Sci Technol* 43, 85–95.
- Santi-Gadelha, T., de Almeida Gadelha, C. A., Aragão, K. S., de Oliveira, C., Lima Mota, M. R., Gomes, R. C., and Cavada, B. S. (2006) Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(4), 1050-1055.
- Silva, J. A.T., Rana, T. S., Narzary, D., Verma, N., Meshram, D. T., and Ranade, S. A. (2013) Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*, 160, 85-107.
- Tchesnokova, V., Aprikian, P., Kisiela, D., Gowey, S., Korotkova, N., Thomas, W., & Sokurenko, E. (2011). Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits an immune response that enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 79(10), 3895-3904.
- Wagner, C., Barlag, B., Gerlach, R. G., Deiwick, J., & Hensel, M. (2014) The *Salmonella enterica* giant adhesin SiiE binds to polarized epithelial cells in a lectin-like manner. *Cellular microbiology*, 16(6), 962-975.
- World Health Organization. (2012). Critically important antimicrobials for human medicine. World Health Organization.

Figure captions

Figure 1: (A) Chromatography of SF30% (3.9 mg of protein) from sarcotesta extract on chitin column (7.5 x 1.5 cm). The washing step used 0.15 M NaCl and PgTeL was eluted using 1 M acetic acid. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA) and absorbance at 280 nm. (B) SDS-PAGE (12%, w/v) of PgTeL (100 µg) and molecular mass markers stained with Coomassie Brilliant Blue. (C) Gel filtration chromatography of PgTeL (0.7 mg of protein) on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 column coupled to a ÄKTA Prime system. Fractions of 2.0 mL were collected and compared with molecular weight markers.

Figure 2: Inhibition of adherence and invasive capacities of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* to HeLa cell line after incubation with PgTeL at MIC concentrations.

Figure 1

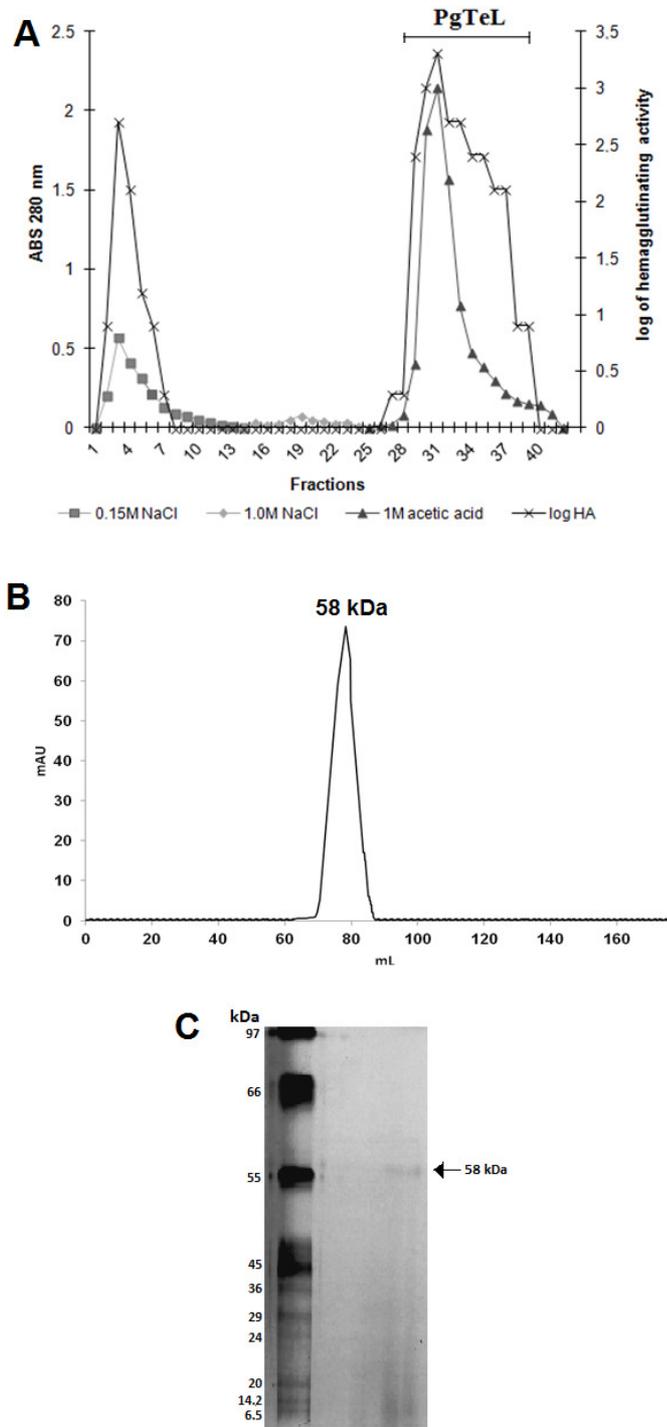


Figure 2

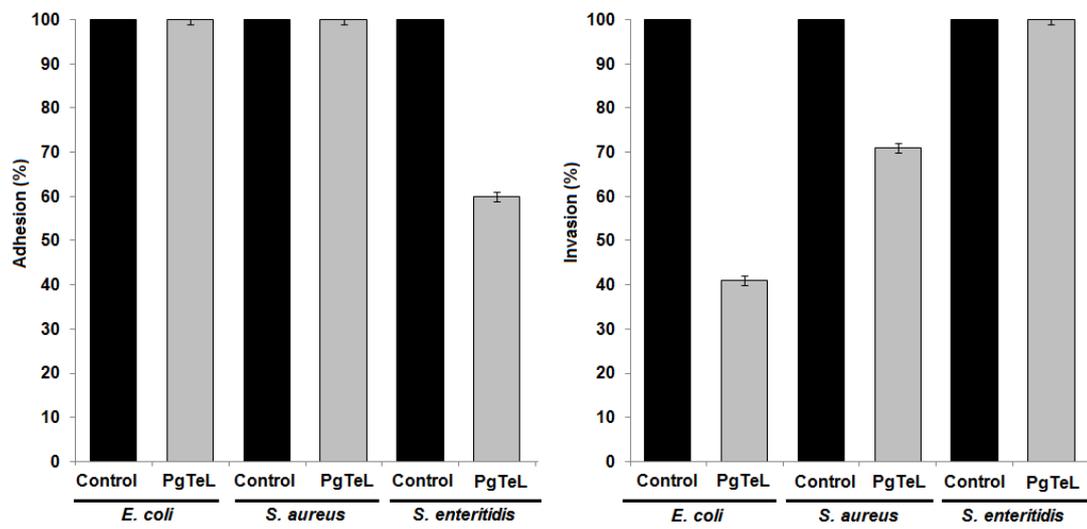


Table 1: Purification of PgTeL

Samples	Protein (mg/mL)	HA (titer ⁻¹)	SHA	Purification (times)
Sarcotesta extract	14	256	18.3	1.0
SF30%	1.31	1,024	782	43
PgTeL	0.105	2,048	19,430	1,061

Hemagglutinating activity (HA) was performed with rabbit erythrocytes. Specific HA (SHA) was calculated from the ratio of titer⁻¹ to protein concentration (mg/mL). Purification was measured as the ratio between the SHA in the stage and SHA of sarcotesta extract. SF30%, supernatant fraction obtained after treatment of sarcotesta extract with ammonium sulphate.

Table 2. Antibacterial activity of PgTeL

Bacteria	PgTeL	
	MIC ^a	MBC ^b
<i>Aeromonas sp.</i>	0.27	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.28	68.4
<i>Escherichia coli</i>	0.27	0.27
<i>Klebsiella sp.</i>	20	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	8.0	8.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.27	68
<i>Serratia marcescens</i>	1.25	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	ND
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.27	68.4
<i>Streptococcus mutans</i>	9.0	9.0

^aMIC (minimum inhibition concentration) and ^bMBC (minimum bactericide concentration) expressed in µg/mL of protein. ND: not detected.

Table 3: Antifungal activity of PgTeL.

Fungi	PgTeL	
	MIC ^a	MFC ^b
<i>Candida albicans</i>	25	50
<i>Candida krusei</i>	12.5	12.5
<i>Candida parapsilosis</i>	6.25	6.25
<i>Candida pelliculosa</i>	25	25
<i>Candida tropicalis</i>	12.5	12.5

^aMIC (minimum inhibition concentration) and ^bMFC (minimum fungicide concentration) expressed in µg/mL of protein.

6. CONCLUSÃO

O estudo revelou que a sarcotesta de *P. granatum* contém uma lectina (PgTeL) com atividade hemaglutinante em valores de temperatura e pH do corpo humano. A toxicidade de PgTeL sobre bactérias e fungos de importância médica e seu efeito na inibição da aderência e invasão bacteriana indica sua potencial aplicação como biomaterial com ação antimicrobiana.