

**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

**Estudo dos efeitos biológicos de pectinas extraídas de diferentes  
tipos de frutos no tratamento de células de câncer do epitélio  
intestinal**

Raissa Sansoni do Nascimento

Tese para obtenção do grau de

**DOUTORA**

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fabi

São Paulo

2020

Raissa Sansoni do Nascimento

**Estudo dos efeitos biológicos de pectinas extraídas de diferentes  
tipos de frutos no tratamento de células de câncer do epitélio  
intestinal**

**Versão original**

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da Universidade de  
São Paulo como requisito para obtenção do título de  
Doutora em Ciência dos Alimentos.

Área de concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fabi

São Paulo

2020

Autorizo a divulgação e reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

N244e	Nascimento, Raissa Sansoni Estudo dos efeitos biológicos de pectinas extraídas de diferentes tipos de frutos no tratamento de células de câncer do epitélio intestinal / Raissa Sansoni Nascimento. - São Paulo, 2020. 114 p.  Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Fabi, João Paulo  1. pectina . 2. câncer. 3. galectina-3. 4. metástase. 5. polissacarídeos. I. T. II. Fabi, João Paulo, orientador.
-------	---

Raissa Sansoni do Nascimento

Comissão Julgadora da  
Tese para obtenção do grau de Doutora

Pro. João Paulo Fabi  
Orientador/Presidente

---

1° Examinador

---

2° Examinador

---

3° Examinador

---

4° Examinador

São Paulo,

de 2020.

*Para minha avó Nair, uma pessoa iluminada (in memoriam)*

Agradeço a todos que, de alguma forma, ajudaram-me nessa jornada rumo ao tão sonhado doutorado: ao meu orientador, João Paulo Fabi, que acreditou no meu trabalho e sempre esteve disponível para clarear e nortear o caminho - com o empenho, dedicação e paciência. Agradeço a todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, centro de excelência em pesquisa.

Um agradecimento especial para Janayra, Lucas, Rodrigo, Ellen, Mayra, Isis e Tânia pela amizade e apoio. A companhia de vocês tornou tudo mais agradável. Agradeço à minha família e amigos, em especial à minha mãe pela presença em todos os momentos, dando-me forças para continuar. Ao Sérgio, pelo auxílio e sugestões bem-vindas. Ao Michel, pela parceria e compreensão que tornaram o caminho mais leve. Agradeço também por me acompanhar nas horas de estudo aos finais de semana.

Caso eu tenha esquecido o seu nome e de alguma forma você tenha colaborado, sinta-se agradecido. Nesses 4 anos todos vocês formaram os elos que fizeram minha vida ser mais significativa e plena.

Agradeço ao Prof. Paulo Mourão da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela realização dos espectros de ressonância nuclear magnética.

Agradeço ao Laboratório de Espectroscopia Molecular no Instituto de Química da Universidade de São Paulo onde pude realizar as análises de FTIR.

Agradeço ao Lucas pelas análises de Dot Blot e parceria na produção em larga escala de Gal-3 recombinante.

Agradeço as bolsas de estudos fornecidas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Ciência e

Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) 2012/23970-2, 2013/07914-8, 2016/10895-3.

## RESUMO

NASCIMENTO, Raissa Sansoni. **Estudo dos efeitos biológicos de pectinas extraídas de diferentes tipos de frutos no tratamento de células de câncer do epitélio intestinal**. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Área de Bromatologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 104 p, 2020.

**Orientador:** Prof. Dr. João Paulo Fabi

As pectinas são fibras dietéticas solúveis que podem apresentar atividade antitumoral ao se ligarem à proteína pró-metastática galectina-3 (GAL-3) produzidas por células cancerosas. Essa ligação e a consequente inibição da GAL-3 reduz a capacidade das células cancerosas de se comunicarem bioquimicamente, levando a uma diminuição da proliferação celular. O presente projeto teve por objetivo estabelecer a relação entre a composição química das pectinas de chuchu, mamão e maracujá não modificadas e modificadas quimicamente com possíveis efeitos benéficos sobre o cultivo de células de câncer epitelial de cólon. Durante a execução do projeto, foram realizados experimentos para extrair, purificar e caracterizar quimicamente frações de polissacarídeos não-amido hidrossolúveis não modificados e modificados de chuchu, mamão e maracujá. Essas frações foram testadas quanto à pureza (presença de proteínas e compostos fenólicos) e quanto à afinidade à GAL-3 humana recombinante, além de testes em culturas de células de câncer colorretal, avaliando a ação dos tratamentos na viabilidade celular, no ciclo celular, apoptose e na expressão de genes. O estudo da possível interação da GAL-3 com determinados ligantes foi realizado através do teste de hemaglutinação utilizando hemácias de coelho comercialmente disponíveis; a resposta biológica *in vitro* em relação ao tratamento de células de câncer epitelial de cólon foi realizada através da análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. A citometria de fluxo mostrou que as pectinas modificadas provocaram a parada do ciclo na fase G1 e induziram a apoptose tardia nas células. A expressão de genes relacionados com a apoptose, regulação, migração, diferenciação e proliferação celular foi feita por qPCR e os resultados se mostraram diferentes, dependendo do tipo de fração pectínica e da linhagem celular analisada. As frações de polissacarídeos que foram modificadas quimicamente apresentaram tamanho molecular médio reduzido, resultando em uma maior liberação de galacturonanos e um maior potencial inibitório de GAL-3.



Observou-se também uma menor manutenção da viabilidade celular em células tumorais epiteliais colorretais (linhagens celulares HCT-116 e HT-29), além do efeito citostático dos tratamentos no ciclo celular e indução de apoptose tardia. Esses efeitos biológicos positivos podem ser consequência da diminuição do peso molecular e da presença de galactanos, mostrando que a modificação química de polissacarídeos não-amido de frutos pode aumentar a atividade biológica *in vitro* em culturas de células de câncer de cólon.

**Palavras-chave:** pectina, pectina modificada, chuchu, mamão, maracujá, polissacarídeos, galectina-3, câncer, metástase.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Raissa Sansoni. **Study of the biological effects of pectins extracted from different types of fruits in the treatment of cancer cells of the intestinal epithelium.** Thesis (Doctoral Degree in Science). Graduate Program in Food Science, Bromatology, Scholl of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil, 104 p, 2020.

**Advisor:** Prof. Dr. João Paulo Fabi

Pectins are soluble dietary fibers that can show anti-tumor activity when they bind to the pro-metastatic protein galectin-3 (GAL-3) produced by cancer cells. This binding and the consequent inhibition of GAL-3 reduces the ability of cancer cells to communicate biochemically, leading to a decrease in cell proliferation. The purpose of this project was to establish the relationship between the chemical composition of unmodified and chemically modified chayote, papaya and passion fruit pectins with possible beneficial effects on the cultivation of colon epithelial cancer cells. During the execution of the project, experiments have been carried out to extract, purify and chemically characterize unmodified and modified water-soluble non-starch polysaccharides fractions of chayote, papaya and passion fruit. These fractions were tested for purity (presence of proteins and phenolic compounds) and for affinity with recombinant human GAL-3, in addition to tests on colorectal cancer cell cultures, evaluating the action of treatments on cell viability, in the cell cycle, apoptosis and gene expression. The study of the possible interaction of GAL-3 with certain ligands has been carried out through the hemagglutination test using commercially available rabbit red blood cells; the biological response *in vitro* in relation to the treatment of epithelial colon cancer cells has been carried out through the analysis of cell viability by the MTT assay. Flow cytometry showed that the modified pectins caused the cell cycle arrest in G1 and induced late apoptosis. The expression of genes related to apoptosis, regulation, migration, differentiation and cell proliferation was measured by qPCR and the results were different, depending on the type of pectic fraction and the cell line analyzed. The polysaccharide fractions that were chemically modified showed reduced average molecular size, resulting in a greater release of galacturonans

and a greater inhibitory potential for GAL-3. It was also observed a lower maintenance of cell viability in colorectal epithelial tumor cells (cell lines HCT-116 and HT-29), in addition to the cytostatic effect of treatments on the cell cycle and induction of late apoptosis. These positive biological effects may be a consequence of the decrease in molecular weight and the presence of galactans, showing that chemical modification of non-starch polysaccharides from fruits can increase the biological activity *in vitro* in colon cancer cell cultures.

**Keywords:** pectin, modified pectin, chayote, papaya, passion fruit, polysaccharides, galectin-3, cancer, metastasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1. Diferentes atividades anti-tumorais da pectina.** A) Como fibra dietética, a pectina não é digerida no trato digestivo superior e pode proteger as células de ataques mutagênicos. No cólon, a pectina é fermentada por bactérias e inibe a inflamação do cólon, prevenindo a carcinogênese. B) A pectina modificada quimicamente (pH) é capaz de interagir com a galectina-3, inibindo as interações célula-célula e a metástase das células cancerígenas. C) A pectina rica em homogalacturananos compete com LPS (lipopolissacarídeo) para se ligar ao TLR4 (receptor do tipo Toll 4), impedindo assim a ativação de células inflamatórias. D) A pectina modificada termicamente estimula a apoptose em células cancerosas, de uma maneira independente de galectina-3. (Figura adaptada de Leclere *et al.* 2013 - *Anti-cancer properties of pectin*). ..... 28

**Figura 2. Fluxograma de trabalho com as análises desenvolvidos durante o projeto, após a extração, purificação e modificação química dos polissacarídeos.** ..... 32

**Figura 3. Fluxograma simplificado com as etapas de extração e purificação das pectinas modificadas e não modificadas de chuchu, mamão e maracujá.** \* Apenas as amostras de chuchu passaram pelo processo de retirada do amido. Cada um dos frutos (chuchu, mamão e maracujá) deu origem a três tipos de amostras diferentes: FSA, fração solúvel em água sem modificação química; FSA EM, fração solúvel em água extraída e modificada com a extração da fração solúvel ocorrendo antes da modificação química; FSA ME, fração solúvel em água modificada e extraída, com a modificação química ocorrendo previamente e realizada na fração celular total antes da extração em água.... 35

**Figura 4. Esquema simplificado e ilustrativo com as etapas da produção de galectina-3 recombinante.** Gal3-GST, Galectina-3 ligada com o tag de Glutathione-S-transferase; PP-GST, PreScission Protease ligada ao tag de Glutathione-S-transferase. .... 44

**Figura 5. Possíveis interações no ensaio de inibição da hemaglutinação.** ..... 49

**Figura 6. Representação resumida com ilustrações das etapas de trabalho para a realização do qPCR.** A imagem fornece informações sobre os métodos e kits utilizados nos ensaios. .... 55

**Figura 7. Microplaca de 96 poços utilizada para análise de teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu.** Nas três primeiras linhas (A, B e C) a curva de calibração com ácido gálico em triplicata. Amostras de A1 a A9 em triplicata: A1 - FSA de chuchu, A2 – FSA de mamão, A3 – FSA de maracujá, A4 – FSA ME de chuchu, A5 – FSA ME de mamão, A6 – FSA ME de maracujá, A7 – FSA EM de chuchu, A8 – FSA EM de mamão e A9 – FSA EM de maracujá..... 57

**Figura 8. Caracterização das pectinas através da distribuição do peso molecular médio pelo sistema HPSEC-RID (High Performance Size Exclusion Chromatography with Refractive Index Detector – Agilent, USA).** Na imagem podemos ver a sobreposição dos cromatogramas por exclusão de tamanho, o perfil cromatográfico das amostras está representado em conjunto com a regressão linear (reta pontilhada) obtida a partir dos padrões moleculares utilizados na análise. V0: Volume de exclusão total (volume morto); Ve: Volume de Permeação Total (volume de eluição). As frações de pectina quimicamente modificadas mostraram uma diminuição do peso molecular aparente, o que poderia favorecer o aumento de sua atividade biológica. O gráfico de HPSEC do chuchu está apresentado com escala igual aos outros gráficos para fins comparativos. Ao lado dele, um gráfico está representado com a escala completa para visualização completa de todos os picos. .... 59

**Figura 9. Caracterização das pectinas através da composição de monossacarídeos pelo sistema HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection – Dionex, EUA).** Gráfico em barras dispendo os valores obtidos em % (mol) para cada monossacarídeo constituinte das amostras analisadas. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas. .... 62

**Figura 10. Análise qualitativa de oligossacarídeos por meio de cromatografia de íons de alto desempenho HPLC-PAD.** Na análise dos cromatogramas, podemos observar que no processo de modificação das pectinas uma parte dos oligossacarídeos de chuchus e mamões foi perdida, mas isso parece não ter interferido na atividade biológicas das referidas frações (FSA ME e FSA EM). As amostras de maracujás não apresentaram grandes quantidades de oligossacarídeos. .... 66

**Figura 11. Espectroscopia de infravermelho (FT-IR) de diferentes amostras de pectinas de chuchu, mamão e maracujá.** Espectro por infravermelho de pectinas de citrus com 46% de esterificação (padrão- representado pela cor preta), frações FSA (cor azul), frações FSA EM (cor verde) e frações FSA ME (cor vermelha). Os gráficos foram construídos com a utilização do software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA)..... 70

**Figura 12. Ensaio de Immunodot blot de frações pécticas dos frutos.** As amostras foram investigadas com LM5 para (1-4) - $\beta$ -D-galactanos, LM16 para arabinanos – RGI, LM19 para HG não esterificado e LM20 para HG esterificado com metil. Os controles foram pectinas de citros com 64% e 28 % de esterificação. .... 73

**Figura 13. Estrutura e composição do homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI), ramnogalacturonano II (RGII) e xilogalacturonano das paredes celulares das plantas.** Figura adaptada de Benians, T. A. S. (2012). In situ analysis of cotton fibre cell wall polysaccharides. University of Leeds. .... 75

**Figura 14. Digestão das pectinas de chuchu, mamão e maracujá (frações FSA ME) com a enzima GAL à esquerda e com GAL e PG à direita. .... 76**

**Figura 15. Determinação estrutural das amostras FSA ME de chuchu, mamão e maracujá previamente digeridas com GAL por espectroscopia de RMN.** Os espectros de RMN das amostras digeridas mostram que restou um esqueleto de homogalacturonanos e não foi detectado resíduos de ramnose, provavelmente devido a níveis não detectáveis do monossacarídeo..... 78

**Figura 16. SDS-PAGE de amostras de proteínas. Diferentes concentrações de galectina-3 foram aplicadas em gel de poli(acrilamida) a 10%.** O padrão usado foi Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). O peso molecular da gal-3 é de aproximadamente 30 kDa. .... 79

**Figura 17. SDS-PAGE de amostras de sobrenadantes da expressão bacteriana e da purificação da GAL-3 utilizando as beads de GST.** Diferentes amostras das etapas do processo de produção da gal-3 recombinante foram aplicadas em gel de poli(acrilamida) a 10%. O padrão usado foi o *Unstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Antes da purificação da proteína recombinante GAL-3, o peso das amostras era de 50 kDa (GAL-3 + GST), após a purificação o peso molecular é de 30 kDa. .... 79

**Figura 18. Ensaio de inibição da hemaglutinação com sangue de coelho.** Legendas: A1 - FSA de chuchu; A4 - FSA ME de chuchu; A7 - FSA EM de chuchu; A2 - FSA de mamão; A5 - FSA ME de mamão; A8 - FSA EM de mamão; A3 - FSA de maracujá; A6 - FSA ME de maracujá; A9 - FSA EM de maracujá. Titulação de Galectina-3, o valor escolhido na curva foi o de 6 µl (concentração da galectina: 1mg/mL). Controles: Curva de lactose nas massas de 2, 4, 6 e 8 µg; G - galectina + hemácias (controle positivo); 0 - apenas hemácias (controle negativo). As frações modificadas dos frutos (A4, A7, A5, A8, A6 e A9) inibiram a hemaglutinação de uma forma visivelmente mais clara e similar a lactose. O peso molecular diminuído pela modificação química, nestas frações, as torna mais solúveis. Concentração das amostras de pectina 1 µg/µl..... 82

**Figura 19. Gráficos de viabilidade celular (em porcentagem) da linhagem HCT 116 representados em barras.** As letras (A,B,C e D) representam, em ordem crescente de relevância, a diferença estatística obtida entre os dados comparados com o controle (apenas células), acordo com teste de Dunnett (A -  $p \leq 0,05$ ; B -  $p \leq 0,01$ ; C -  $p \leq 0,001$ ; D -  $p \leq 0,0001$ ; n = 9)..... 84

**Figura 20. Gráficos de viabilidade celular (em porcentagem) da linhagem HT 29 representados em barras.** As letras (A,B,C e D) representam, em ordem crescente de relevância, a diferença estatística obtida entre os dados comparados com o controle (apenas células), acordo com teste de Dunnett (A -  $p \leq 0,05$ ; B -  $p \leq 0,01$ ; C -  $p \leq 0,001$ ; D -  $p \leq 0,0001$ ; n = 9)..... 85

**Figura 21. Análise da citotoxicidade dos polissacarídeos nas células de linhagem HCT 116 e HT 29 após 24 h de incubação.** As porcentagens de citotoxicidade foram determinadas pelo cálculo das médias de absorbância das amostras e controles em triplicata, subtraindo-se de cada um deles o valor da absorbância obtida no branco (apenas células). Os valores foram usados na seguinte equação: Citotoxicidade (%) = (controle alto – controle baixo)/(valor das amostras - controle baixo). A análise foi realizada no *software* Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA), a diferença estatística foi obtida entre os dados das frações FSA, FSA EM e FSA ME dos frutos comparados com o controle (Triton-X), de acordo com teste de Dunnett,  $P < 0,0001$ . ..... 86

**Figura 22. Histogramas com a progressão da distribuição das células HCT116 nas fases do ciclo celular.** \* Após 72 horas, as células tratadas com as amostras FSA ME de mamão e maracujá apresentaram intensa morte celular, isto pode ter interferido na proporção das células nas fases do ciclo 72H. Os ensaios foram realizados de forma independente com triplicatas biológicas e quantificados com o *software* FlowJo (versão 10.0.7, Ashland,OR, EUA).....88

**Figura 23. Distribuição do ciclo celular em células HCT116, tratadas com pectinas de chuchu, frações FSAEM e FSAME, nos tempos 24, 48 e 72 horas.** As frações escolhidas foram as que apresentaram os melhores resultados na inibição da viabilidade celular. Os controles utilizados neste ensaio foram células sem tratamento e células tratadas com DMSO. Observa-se, nas amostras tratadas com as pectinas de chuchu, uma diminuição do percentual de células que passam da fase G0 G1 para a fase S com o decorrer do tempo. Nas amostras tratadas com as frações FSAME a morte celular após 72 horas foi acentuada, essa diminuição na viabilidade celular pode interferir na proporção dos resultados. .... 89

**Figura 24. Distribuição do ciclo celular em células HCT116, tratadas com pectinas de mamão frações FSAEM e FSAME, nos tempos 24, 48 e 72 horas.** As frações escolhidas foram as que apresentaram os melhores resultados na inibição da viabilidade celular. Os controles utilizados neste ensaio foram células sem tratamento e células tratadas com DMSO. Observa-se, nas amostras tratadas com as pectinas de mamão, uma diminuição do percentual de células que passam da fase G0G1 para a fase S com o decorrer do tempo. Nas amostras tratadas com as frações FSAME a morte celular após 72 horas foi acentuada, essa diminuição na viabilidade celular pode interferir na proporção dos resultados..... 90

**Figura 25. Distribuição do ciclo celular em células HCT116, tratadas com pectinas de maracujá frações FSAEM e FSAME, nos tempos 24, 48 e 72 horas.** As frações escolhidas foram as que apresentaram os melhores resultados na inibição da viabilidade celular. Os controles utilizados neste ensaio foram células sem tratamento e células tratadas com DMSO. Observa-se, nas amostras tratadas com as pectinas de maracujá, uma diminuição do percentual de células que passam da fase G0G1 para a fase S com o decorrer do tempo. Nas amostras tratadas com as frações FSAME a morte celular após 72 horas foi acentuada, essa diminuição na viabilidade celular pode interferir na proporção dos resultados. .... 91

**Figura 26. As pectinas modificadas dos frutos induziram a parada do ciclo celular da fase GO-G1 para a fase S em células da linhagem HCT116.** A análise foi realizada no *software* Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA). Foram apresentados resultados da média geométrica das porcentagens de células na fase S de três experimentos independentes. .... 92

**Figura 27. Efeitos das frações de pectina de chuchu (CH FSAME), mamão (MM FSAME) e maracujá (MA FSAME) a 0,1% na apoptose de células HCT116 por citometria de fluxo.** As células cancerígenas foram induzidas a apoptose tardia após o tratamento com as frações de pectina dos frutos por 24 horas. Q1: quadrante de apoptose inicial; Q2: quadrante de apoptose tardia; Q3: quadrante de necrose; Q4: quadrante de células viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com média desvio padrão de dois experimentos independentes para cada linhagem celular e comparados com o controle (células sem tratamento). .... 95

**Figura 28. Efeitos dos polissacarídeos de chuchu, mamão e maracujá na expressão de genes relacionados com a apoptose (HADC1, TNF, RIPK1, BCL2 e MLKL), crescimento e proliferação celular (TGFβ1, interleucina-1, EGF, CCNB1IP1 e MTOR), fatores de transcrição/reguladores (HADC5 e NFκB1), degradação da matriz celular (MMP-9) e adesão celular (CDH1), em células de carcinoma colorretal da linhagem HCT 116.** A média geométrica dos valores de CT (limiar do ciclo) dos genes normatizadores (ACTB, GADH e UCHL5), foram usadas para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo analisados, segundo o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak et al. (2001). Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados representados como média ± SEM. Foi realizada análise de variância one-way ANOVA com o teste de Dunnett, que avalia diferenças entre o grupo controle e os demais grupos (significância  $P < 0.05$ ). .... 98

**Figura 29. Efeitos dos polissacarídeos de chuchu, mamão e maracujá na expressão de genes relacionados com a apoptose (HADC1, TNF, RIPK1, BCL2 e MLKL), crescimento e proliferação celular (TGFβ1, interleucina-1, EGF, CCNB1IP1 e MTOR), fatores de transcrição/reguladores (HADC5 e NFκB1), degradação da matriz celular (MMP-9) e adesão celular (CDH1), em células de carcinoma colorretal da linhagem HT 29.** A média geométrica dos valores de CT (limiar do ciclo) dos genes normatizadores (ACTB, GADH e UCHL5), foram usadas para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo analisados segundo o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak et al. (2001). Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados representados como média ± SEM. Foi realizada análise de variância one-way ANOVA com o teste de Dunnett, que avalia diferenças entre o grupo controle e os demais grupos (significância  $P < 0.05$ ). .... 99



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Teor de água dos frutos.....	56
<b>Tabela 2.</b> Rendimentos das extrações.....	56
<b>Tabela 3.</b> Valores dos pesos moleculares das frações de polissacarídeos.....	60
<b>Tabela 4.</b> Comparação da composição de monossacarídeos do chuchu entre estudos.....	64
<b>Tabela 5.</b> Grau de esterificação das amostras segundo a curva linear padrão.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
BCL-2	B-cell lymphoma protein 2
DCTN	Doenças crônicas não transmissíveis
DE	Grau de esterificação
DM	Grau de metoxilação
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FCT	Fração celular total
FSA	Fração solúvel em água
FSA EM	Fração solúvel em água extraída e modificada
FSA ME	Fração solúvel em água modificada e extraída
Fuc	Fucose
GalA	Ácido galacturônico
Gal	Galactose
GAL-3	Galectina-3
GlcA	Ácido glucurônico
HG	Homogalacturonanos
HPSEC- RID	<i>High performance size exclusion chromatography coupled to a refractive index detector</i>
HPAEC- PAD	<i>High performance anion-exchange chromatography coupled to pulse amperometric detector</i>
ICAM 1	Molécula de adesão intercelular 1
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo

Man	Manose
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMC	Pectina modificada de citros
RG-I	Ramnogalacturonano I
Rha	Ramnose
RMN	Ressonância nuclear magnética
TBA	Álcool butílico terciário
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Xyl	Xilose
$\beta$ -TGF	Fator de transformação de crescimento beta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 Câncer de Cólon .....	24
1.2 Fibras Dietéticas .....	25
1.3 Pectinas .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Extrações de parede celular dos frutos e modificações químicas</b> .....	<b>33</b>
4.1.1 Amostras .....	33
4.1.2 Extração e purificação das pectinas da parede celular dos frutos	33
4.1.3 Extração da Fração Solúvel em Água (FSA) das pectinas dos frutos .....	35
4.1.4 Análise qualitativa de amido .....	36
4.1.5 Extração de polissacarídeos não amido das pectinas de chuchu - hidrólise com amilase e protease .....	36
4.1.6 Modificação química (pH) das pectinas dos frutos .....	37
4.1.7 Rendimentos das extrações .....	38
<b>4.2 Caracterização físico-química dos polissacarídeos</b> .....	<b>38</b>
4.2.1 Caracterização das pectinas através da análise de distribuição do peso molecular médio .....	38
4.2.2 Determinação do teor de proteínas .....	38
4.2.3 Detecção de compostos fenólicos livres .....	39
4.2.4 Caracterização das pectinas através da composição de monossacarídeos .....	39
4.2.5 Análise qualitativa dos oligossacarídeos .....	40
4.2.6 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Grau de Esterificação .....	40
4.2.7 Digestão Enzimática .....	41
4.2.8 Caracterização por RMN – Ressonância Nuclear Magnética .....	42
4.2.9 Immuno Dot Blot .....	43
<b>5. ANÁLISES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>43</b>
<b>5.1 Análise de afinidade das frações pécticas com a GAL-3 – Ensaio de Hemaglutinação</b> .....	<b>43</b>
5.1.1 Produção e purificação de galectina-3 recombinante .....	44
5.1.2 Indução .....	45
5.1.3 Lise bacteriana .....	45

5.1.4	Purificação das proteínas recombinantes .....	46
5.1.5	Análise qualitativa da expressão da proteína Galectina 3 utilizando SDS-PAGE .....	46
5.1.6	Análise quantitativa das proteínas recombinantes .....	47
5.1.7	Ensaio de Hemaglutinação .....	47
5.2	<i>Tratamento de células humanas com as pectinas das frutas</i> .....	49
5.2.1	Cultivo e tratamento das células .....	49
5.2.2	Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (redução do MTT) .....	50
5.2.3	Análise de citotoxicidade (LDH) .....	51
5.2.4	Análise da distribuição das fases do ciclo celular através da citometria de fluxo .....	51
5.2.5	Detecção de Apoptose através da citometria de fluxo .....	52
6.	Parâmetros Gênicos.....	53
6.1	Análise de biomarcadores genéticos (PCR em tempo real) .....	53
7.	Análise Estatística .....	55
8.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
8.1	Teor de água dos frutos e rendimentos das extrações .....	56
8.2	Caracterização as amostras de polissacarídeos com relação a presença de compostos fenólicos livres e proteínas .....	57
8.3	Efeitos da modificação química no perfil e composição das frações pécticas de chuchu, mamão e maracujá .....	58
8.3.1	<i>Efeitos na distribuição de peso molecular</i> .....	58
8.3.2	Diferenças na composição dos monossacarídeos e análise de oligossacarídeos.....	61
8.4	Perfil das amostras com relação ao grau de esterificação e FT-IR.....	67
8.5	<i>Immunodot Blot</i> .....	71
8.6	Digestão enzimática .....	74
8.7	RMN .....	77
8.8	Análise do processo de obtenção e quantificação de Galectina-3 recombinante.....	78
8.9	Efeito das frações pécticas quanto ao potencial de inibição da Gal-3	80
8.10	Efeito das frações pécticas na proliferação celular .....	82
8.11	Efeitos das frações pécticas na citotoxicidade – LDH.....	86
8.12	Efeitos das frações pécticas no ciclo celular .....	87
8.13	Efeitos das frações péctica na indução da apoptose .....	94
8.14	Efeitos dos polissacarídeos na expressão de biomarcadores genéticos (PCR em tempo real) .....	96
8.14.1	Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a apoptose.....	96

8.14.2 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados ao crescimento e proliferação celular.....	102
8.14.3 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a fatores de transcrição .....	104
8.14.4 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a degradação da matriz celular .....	105
8.14.5 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a adesão celular .....	105
9. CONCLUSÕES .....	106
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107

## 1. INTRODUÇÃO

Os hábitos e estilo de vida do homem contemporâneo fizeram com que diversas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) se tornassem mais comuns na população. Dentre os vários fatores que contribuem para esse avanço, pode-se citar uma alimentação inadequada, com baixas quantidades de produtos derivados de frutas e hortaliças (Popkin, 1999). A urbanização populacional, industrialização e modernização crescentes, associadas a novos estilos de vida, influenciaram as pessoas na procura por uma dieta baseada em alimentos processados (Popkin, 2006). De acordo com vários estudos epidemiológicos, a ingestão de alimentos industrializados, com baixa quantidade em fibras, aliada a uma diminuição no consumo de frutas e hortaliças, são fatores de risco para a incidência de muitas DCNT, tais como câncer, doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus* e hipertensão arterial (WHO, 2003; Vermelho et al., 2001). As DCNT vêm ocupando um maior espaço no perfil de morbi-mortalidade na sociedade em geral, e hoje se tornaram o novo centro de atenção das doenças no Brasil e no mundo (Schramm et al., 2004).

Segundo o Inca (Instituto Nacional de Câncer), 60% dos casos de câncer acontecem em regiões onde há um maior consumo de alimentos industrializados (Inca, 2016). Ultimamente, diversos pesquisadores têm correlacionado o fato de que pessoas com uma dieta rica em frutas e vegetais demonstraram, entre inúmeros benefícios, uma menor incidência de câncer de diversos tipos (Van Duyn & Pivonka, 2000). As frutas são conhecidas por sua importância alimentar, pois são excelentes fontes de nutrientes e fibras alimentares. As fibras têm ocupado uma posição de destaque na alimentação humana, pois diversos estudos científicos apontaram para uma ação benéfica desses compostos no

organismo, e a relação entre o seu consumo em quantidades adequadas e a redução do risco de determinadas doenças (Mattos & Martins, 2000).

### **1.1 Câncer de Cólon**

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo. O câncer de cólon possui relevância epidemiológica em nível mundial, uma vez que é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e a quarta principal causa de morte por câncer. Em 2012, a estimativa mundial apontou o câncer de cólon e reto como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens, com 746 mil casos novos (10% do total de câncer) e o segundo nas mulheres, com 614 mil casos novos (9,2% do total de câncer). Para o Brasil, estimam-se 17.380 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 18.980 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. É o terceiro mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma (INCA, 2017).

O câncer de cólon e reto é considerado uma doença multifatorial influenciada por fatores genéticos, ambientais e relacionados ao “estilo de vida”. O consumo de alimentos ricos em fibras é considerado um fator protetor contra a doença (INCA, 2016). Alguns compostos naturais, como as pectinas, possuem a capacidade de modular, de diversas maneiras, as vias bioquímicas envolvidas na proliferação e metástase do câncer.



## 1.2 Fibras Dietéticas

As fibras dos alimentos vegetais são formadas por polissacarídeos não metabolizados pelas enzimas humanas, podendo apresentar alto e baixo pesos moleculares, sendo classificadas em solúveis e insolúveis baseadas em seu grau de solubilidade em água segundo Meyer, (2004) e Cummings & Stephen (2007). Embora essas duas frações atuem no organismo humano de diferentes maneiras, ambas trazem benefícios quando ingeridas regularmente. As fibras alimentares insolúveis intumescem parcialmente em presença de água, não formam géis muito viscosos e são pouco fermentadas pela microbiota intestinal. Essas características fazem com que as fibras insolúveis contribuam para a motilidade intestinal e para o aumento do volume e fluidez do bolo fecal. Entre elas, podemos citar os polissacarídeos derivados de celulose, hemiceluloses e ligninas (Buckeridge & Tiné, 2001). Fibras alimentares solúveis são aquelas que formam géis de consistência viscosa em contato com a água, e cuja intensidade da viscosidade depende da origem do vegetal e da característica dos polissacarídeos. As fibras solúveis influenciam o tempo de digestão no estômago e no intestino delgado, diminuindo o trânsito intestinal e, conseqüentemente, aumentando o tempo de absorção dos nutrientes. Além disso, elas auxiliam na diminuição da quantidade de colesterol plasmático, principalmente os de baixa densidade (LDL) (Bernaud & Rodrigues, 2013). As fibras solúveis são amplamente fermentadas pelas bactérias da microbiota intestinal, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), permitindo assim o crescimento ordenado de células epiteliais intestinais, aumentando as criptas e o conseqüente contato com os nutrientes dos alimentos parcialmente ou totalmente digeridos, o que funcionaria como um segundo mecanismo de aumento de absorção de nutrientes. Dentre as fibras solúveis, destacam-se as

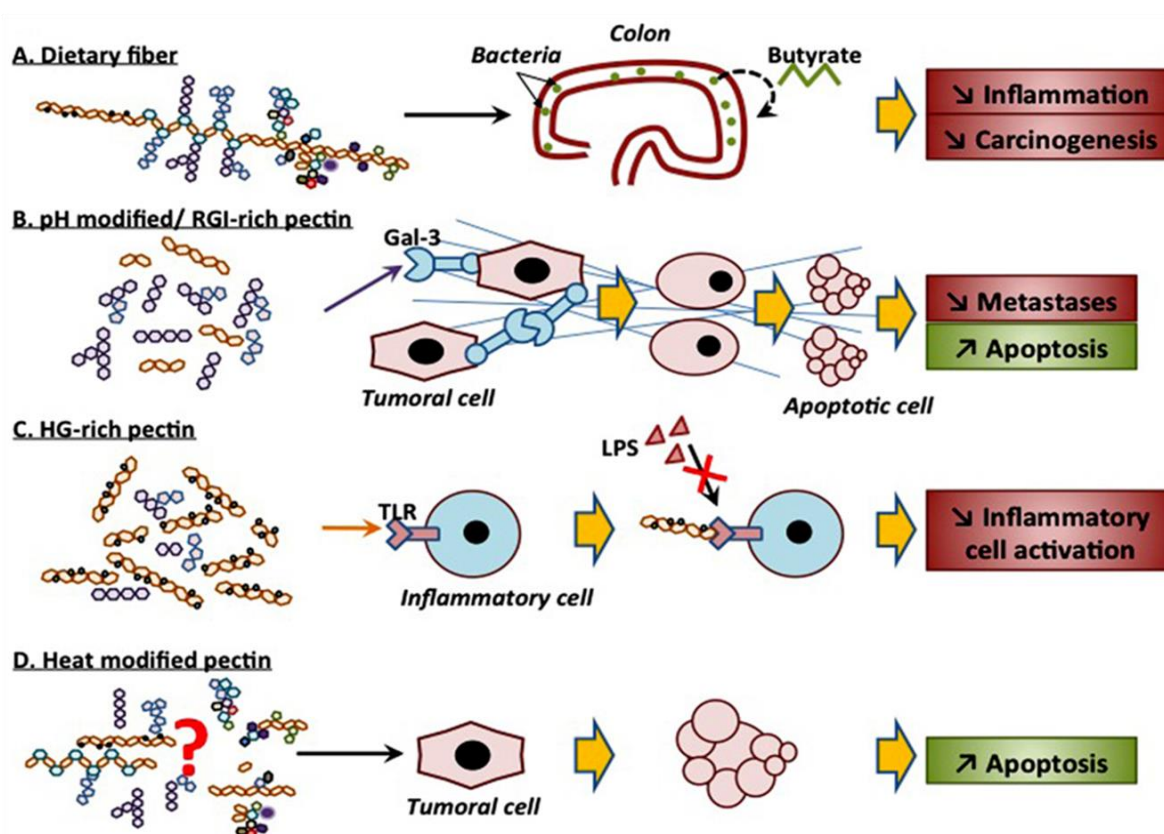
pectinas, as gomas, as mucilagens, os beta-glicanos e algumas hemiceluloses (Gutkoski & Trombeta, 1999; Buckeridge & Tiné, 2001).

### 1.3 Pectinas

As pectinas são fibras solúveis formadas por complexos de polissacarídeos não-amido que auxiliam na estrutura da parede celular dos vegetais, além de contribuírem para a textura e firmeza da polpa durante o crescimento e amadurecimento de frutos carnosos (frutos que contém grande quantidade de polpa) (Fabi *et al.*, 2007). As pectinas de frutas apresentam uma característica bastante hidrofílica devido aos grupos carboxílicos dos açúcares ácidos. São elas utilizadas na indústria de alimentos, no preparo de geleias, doces de frutas, produtos de confeitaria e sucos de frutas pois, como já referido anteriormente, diferentes concentrações de pectinas produzem soluções aquosas com diferentes graus de viscosidade. As matérias primas mais importantes para a obtenção comercial de pectinas constituem-se na polpa e cascas de frutas cítricas (subprodutos da indústria de sucos) e sua utilização se restringe apenas ao uso industrial.

Ultimamente as pectinas têm recebido atenção devido a seus efeitos benéficos além da fermentação no trato gastrointestinal. A pectina mais bem estudada é a pectina modificada de citros (PMC), resultado dos tratamentos térmico, químico e/ou enzimático da pectina de citros nativa, tratamentos que têm por finalidade diminuir o tamanho das cadeias dos polissacarídeos, conferindo características únicas a essas pectinas (Uenojo & Pastore, 2007; Silvab, 2015). Estudos têm evidenciado que a PMC exerce diversas atividades biológicas, incluindo a prevenção e a redução do crescimento de tumores *in vivo* (Leclere *et al.*, 2013). A atividade anticancerígena da pectina modificada foi previamente relatada em

diversos estudos com linhagens celulares. Jackson *et al.* (2007) estudaram o efeito da PMC sobre as células cancerosas da próstata. Yan & Katz (2010) mostraram que a PectaSol-C (nome comercial de um tipo de PMC) induziu a apoptose e inibiu a proliferação de células de câncer de próstata andrógeno-dependentes de humanos e ratos. Os estudos sugeriram que a PMC tem ação anticancerígena devido ao fato de seus galactanos de baixo peso molecular, derivados das porções de ramnogalacturonanos do tipo I, interagirem com a proteína humana galectina-3 (GAL-3). A GAL-3 é uma proteína multifuncional com várias funções biológicas, tais como adesão celular, quimiotaxia, crescimento celular, diferenciação e apoptose. Essa proteína está envolvida no surgimento e desenvolvimento de câncer assim como na inflamação, nas fibroses e doenças cardíacas (Leclere *et al.*, 2013 – Figura 1). Nas células cancerígenas, a GAL-3 tem sua expressão aumentada, ativando vias sinalizadoras de forma indevida, principalmente de receptores das proteínas EGF (fator de crescimento epidérmico) e  $\beta$ -TGF (fator de transformação de crescimento beta), elevando assim as taxas de proliferação e adesão celulares, além de diminuir as taxas de apoptose, levando a um aumento do tumor e do número de metástases (Hao *et al.*, 2013). Além disso, um novo efeito benéfico foi reportado por Maxwell, *et al.* (2015), onde os autores relataram que as porções ácidas das pectinas (homogalacturonanos) induziram a diminuição da expressão de uma proteína responsável pela adesão célula-célula, chamada de ICAM1, o que reduziu o , o que reduziu o crescimento celular (proliferação) *in vitro*.



**Figura 1. Diferentes atividades anti-tumorais da pectina.** A) Como fibra dietética, a pectina não é digerida no trato digestivo superior e pode proteger as células de ataques mutagênicos. No cólon, a pectina é fermentada por bactérias e inibe a inflamação do cólon, prevenindo a carcinogênese. B) A pectina modificada quimicamente (pH) é capaz de interagir com a galectina-3, inibindo as interações célula-célula e a metástase das células cancerígenas. C) A pectina rica em homogalacturananos compete com LPS (lipopolissacarídeo) para se ligar ao TLR4 (receptor do tipo Toll 4), impedindo assim a ativação de células inflamatórias. D) A pectina modificada termicamente estimula a apoptose em células cancerosas, de uma maneira independente de galectina-3. (Figura adaptada de Leclere *et al.* 2013 - *Anti-cancer properties of pectin*).

A pectina modificada de citrus (PMC) é capaz de se ligar fortemente à GAL-3 de maneira competitiva aos ligantes naturais, através do seu domínio de reconhecimento de carboidratos, e esta ligação inibe a modulação da atividade da GAL-3 (Gao *et al.*, 2012). Devido ao fato de que certas pectinas exercem efeitos benéficos, tais como a diminuição do crescimento e proliferação de células de câncer e inibição da metástase em alguns casos, a busca por outros tipos de pectinas que também possam exercer essas funções se torna atrativa. Pectinas de maçã (Olano-Martin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2010), quiabo (Vayssade

*et al.*, 2010), ginseng (Cheng *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2010), e beterraba (Maxwell *et al.*, 2016) extraídas e modificadas de várias maneiras, foram investigados por esses efeitos.

Outros frutos carnosos são candidatos a possuírem esses tipos de pectinas, tais como chuchus, maracujás e mamões. Os chuchus possuem grande quantidade de pectinas, especialmente aquelas ramificadas com galactanos e arabinogalactanos (ramnogalacturonanos do tipo 1) que, quando hidrolisadas, poderiam aumentar as chances de inibir a galectina-3 e exercerem os efeitos benéficos ao organismo humano quando ingeridas (Shiga *et al.*, 2015). Os maracujás possuem grande quantidade de pectinas ácidas derivadas de homogalacturonanos que podem exercer efeitos inibitórios nos mecanismos de adesão célula-célula, inibindo assim a proliferação celular (Seixas *et al.*, 2014). Já os mamões papaia possuem grande quantidade de pectinas ácidas e também aquelas ramificadas com galactanos e arabinogalactanos derivados dos ramnogalacturonanos do tipo I (Shiga *et al.*, 2009), com atividade inibitória na proliferação de células de câncer de cólon já demonstrada (Prado *et al.*, 2017). Essas três fontes de pectinas representam três vegetais com características de polissacarídeos bastante diferentes entre si, e a comparação dos resultados obtidos poderiam abrir novas perspectivas do estudo de tipos alternativos de pectinas de outros vegetais. Sendo assim, o atual projeto visa estabelecer a relação entre a composição química das pectinas de chuchus, maracujás e mamões não modificadas e modificadas quimicamente, com os possíveis efeitos benéficos em células epiteliais de câncer de cólon em modelos *in vitro*.

## 2. JUSTIFICATIVA

As pectinas modificadas de citros já foram identificadas por causarem efeitos benéficos, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. Esses efeitos foram devido à inibição da galectina-3, uma proteína pró-metastática superexpressa em vários tipos de células de câncer. A inibição da galectina-3 é devida à solubilização de galactanos provenientes da despolimerização das porções de ramnogalacturonanos do tipo I resultante das modificações químicas, térmicas ou enzimáticas. Além disso, novos indícios mostram que a interação das células de câncer de intestino com as porções ácidas das pectinas (homogalacturonanos) reduzem a adesão célula-célula em mecanismos bioquímicos independentes da inibição da GAL-3, mas ainda elusivos.

Três frutas de grande produção e aceitação no Brasil (chuchu, maracujá e mamão) também possuem grande quantidade de pectinas com um potencial de ação parecida ao da PMC. Sendo assim, a busca por esses novos tipos de pectinas que possam exercer ambos os efeitos benéficos, tanto de inibição da galectina-3 quando da inibição da adesão célula-célula, poderia representar um avanço na produção de determinados tipos de alimentos funcionais e/ou suplementos alimentares. Das três frutas que serão estudadas, uma delas possui grande quantidade de pectinas com ramificações de galactanos (chuchu); outra tem grande quantidade de pectinas ácidas (maracujá); e outra apresenta a mescla dos dois tipos de pectinas ácidas e ramificadas com galactanos (mamão papaia), mostrando que esses três diferentes tipos de pectinas poderiam apresentar três diferentes benefícios biológicos quando ingeridos. Mas devido ao fato dessas pectinas terem elevado tamanho molecular, que podem diminuir esses possíveis efeitos benéficos (devido à baixa solubilização e a consequente

baixa absorção), comparações serão efetuadas com as pectinas tratadas (modificadas) quimicamente.

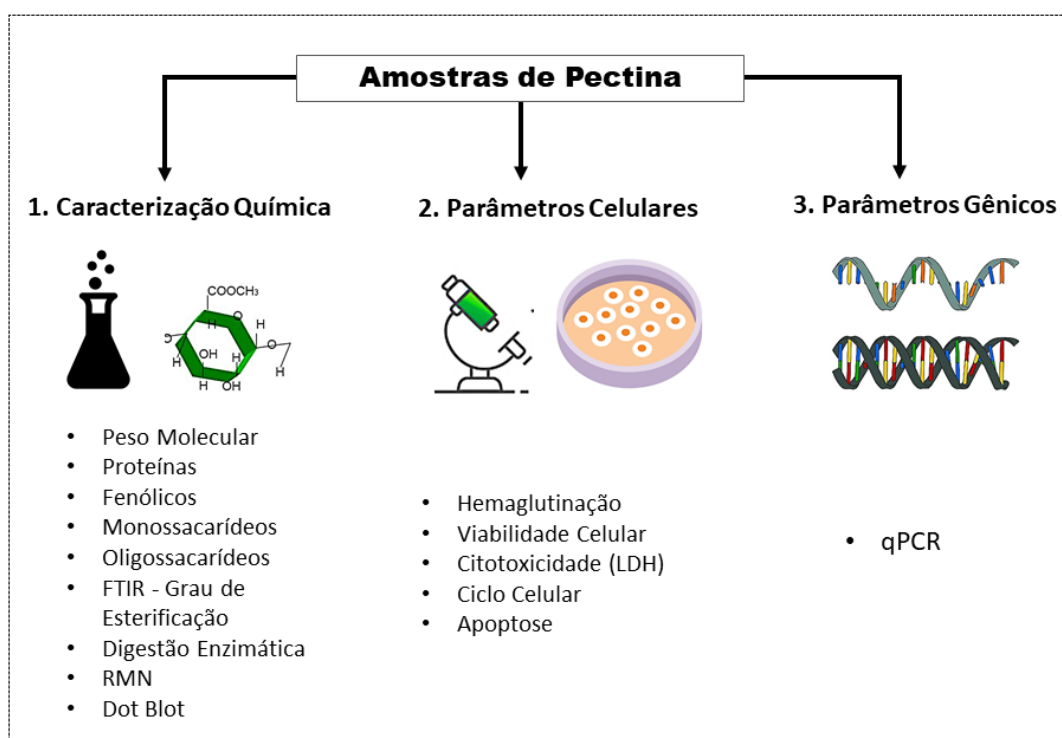
### **3. OBJETIVOS**

Relacionar as composições e estruturas químicas das pectinas modificadas e não modificadas de chuchus, maracujás e mamões com os prováveis efeitos benéficos do seu consumo para a saúde humana. Para tanto, dois objetivos secundários devem ser atingidos.

1. Comparação dos efeitos biológicos das pectinas isoladas dos frutos, com e sem tratamento químico, no ensaio com células humanas de câncer colorretal;
2. Verificar se o tratamento químico de alta intensidade dos polissacarídeos (para aumento da solubilidade) proporcionou algum incremento nos possíveis efeitos biológicos, nos tratamentos com células de câncer, no ensaio de inibição da hemaglutinação, na expressão de genes relacionados com a apoptose, regulação, migração, diferenciação e proliferação celular, e nos eventos de apoptose e ciclo celular.
3. Verificar a possível relação entre as estruturas finas das pectinas in natura e modificadas dos frutos e as suas possíveis atividades biológicas.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Química de Alimentos, Bioquímica e Biologia Molecular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e no FoRC (*Food Research Center*), com exceção da Ressonância Nuclear Magnética (RMN) e da Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A RMN foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Paulo Mourão da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A FTIR foi analisada no Laboratório de Espectroscopia Molecular no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Na figura 2 temos um fluxograma de trabalho com todas as análises realizadas durante o projeto, elas se dividem em 3 grupos: caracterização química, parâmetros celulares e parâmetros gênicos.



**Figura 2. Fluxograma de trabalho com as análises desenvolvidos durante o projeto, após a extração, purificação e modificação química dos polissacarídeos.**



## **4.1 Extrações de parede celular dos frutos e modificações químicas**

### **4.1.1. Amostras**

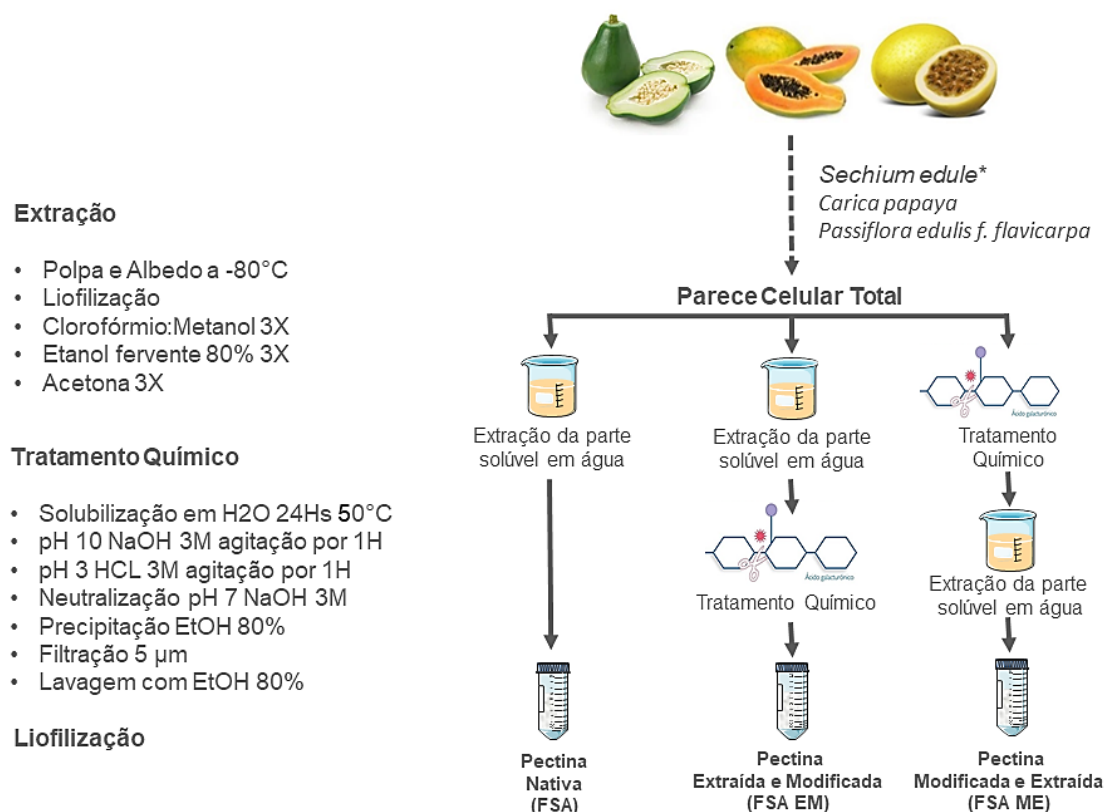
Os chuchus (*Sechium edule*) do cultivar verde claro provenientes de Amparo - SP, maracujás (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) provenientes de Minas Gerais, e mamões (*Carica papaya*) do cultivar 'Golden' provenientes da Bahia, foram obtidos de um fornecedor local (Oba Hortifruti) na cidade de São Paulo em dezembro de 2016, com grau de maturação inicial verdes e transportados diretamente para o laboratório. Os frutos foram higienizados, descascados e as sementes retiradas. As polpas foram picadas manualmente e congeladas em nitrogênio líquido. No caso dos maracujás a parte utilizada foi o albedo (mesocarpo, parte branca do fruto entre a polpa e a casca e rica em pectinas). Todo o material foi armazenado em *ultrafreezer* a -80 °C, e posteriormente as amostras dos frutos foram liofilizadas e trituradas com o auxílio de um *mixer*. As amostras foram pesadas antes e depois da liofilização para o cálculo do teor de água dos frutos.

### **4.1.2 Extração e purificação das pectinas da parede celular dos frutos**

As amostras liofilizadas dos frutos foram extraídas com 3 volumes de clorofórmio:metanol (1:1) para inativação enzimática, retirada de pigmentos, lipídios e proteínas. Após a remoção dos sobrenadantes, para a retirada de açúcares de baixo peso molecular (monossacarídeos), os resíduos foram lavados com 3 volumes de etanol fervente a 80%, e posteriormente secos com 3 volumes de acetona. Depois dessa etapa, os resíduos das extrações em triplicata foram secos em capela e pesados, resultando na fração de parede celular total (FCT). Em seguida, as amostras seguiram 3 caminhos diferentes para obtenção das frações solúveis em água (FSA).

Cada fruto deu origem a 3 amostras diferentes, como mostra a figura 3: FSA - fração solúvel em água (sem modificação); FSA EM - fração solúvel em água extraída e

modificada (a fração solúvel em água foi extraída primeiramente e depois a amostra foi quimicamente modificada); FSA ME – fração solúvel em água modificada e extraída (neste caso, a amostra FCT foi quimicamente modificada e a fração solúvel resultante foi considerada como fração solúvel em água previamente modificada). Foram feitos dois tipos diferentes de extrações de pectinas modificadas quimicamente, tendo por base a premissa de que ao se trabalhar por mais tempo com a fração celular total, antes da modificação química, um possível maior rendimento de extração de pectinas e seria obtido quando comparado apenas à extração em água em temperatura ambiente (simulando o comportamento das fibras no organismo humano). A hipótese aventada é a de que talvez possam existir algumas pectinas com caráter de alta solubilidade em água, mas que estejam ligadas às porções mais insolúveis da parede celular do vegetal e que, pela hidrólise química, possam essas moléculas ser parcialmente hidrolisadas e solubilizadas nas soluções aquosas de tratamento das frações celulares totais.



**Figura 3. Fluxograma simplificado com as etapas de extração e purificação das pectinas modificadas e não modificadas de chuchu, mamão e maracujá.** \* Apenas as amostras de chuchu passaram pelo processo de retirada do amido. Cada um dos frutos (chuchu, mamão e maracujá) deu origem a três tipos de amostras diferentes: FSA, fração solúvel em água sem modificação química; FSA EM, fração solúvel em água extraída e modificada com a extração da fração solúvel ocorrendo antes da modificação química; FSA ME, fração solúvel em água modificada e extraída, com a modificação química ocorrendo previamente e realizada na fração celular total antes da extração em água.

#### 4.1.3 Extração da Fração Solúvel em Água (FSA) das pectinas dos frutos

A fração celular total (FCT) foi extraída 3 vezes com 100 mL de água deionizada e agitação constante por 1 hora em temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, as amostras foram filtradas em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 micrômetros/120 fios (Genesis<sup>TM</sup>, Coréia do Sul). As frações solúveis em água resultantes foram liofilizadas, pesadas e denominadas como frações solúveis em água (FSA), tendo o rendimento de extração calculado. O material final seco, da FSA dos frutos, ficou armazenado em um dessecador.

#### **4.1.4 Análise qualitativa de amido**

Cerca de 0,2 g das amostras FSA de chuchu, mamão e maracujá secas foram testadas previamente com solução de Lugol da Sigma. Uma solução de amido a 3% (amido de batata, Sigma, EUA) foi utilizada como controle. Detectou-se a presença qualitativa de amido apenas nas amostras de chuchu. A presença de amido nas amostras de polissacarídeos, apesar de serem inertes nos tratamentos *in vitro* dos eritrócitos e das células de câncer, pode interferir e alterar os resultados das análises tecnológicas (peso molecular e composição de açúcares) das pectinas. Por esse motivo as amostras de chuchu (FSA e FSA ME) passaram pelo processo de retirada do amido.

#### **4.1.5 Extração de polissacarídeos não amido das pectinas de chuchu - hidrólise com amilase e protease**

Uma solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M e pH 6,0 foi preparada e misturada às amostras totais de FSA e FSA ME de chuchu (pois a FSA EM foi obtida da amostra FSA previamente retirada de amido). Foi adicionada  $\alpha$ -amilase (500  $\mu$ L; Megazyme Internacional Ireland; 3000U mL<sup>-1</sup>) e a mistura ficou sob agitação constante por uma hora em banho-maria a 80°C. Feito o ajuste de pH para 4,5 com HCl 3 M e adicionada amiloglucosidase (1000  $\mu$ L; Megazyme Internacional Ireland, 3300U mL<sup>-1</sup>) à amostra, que ficou por 1 hora no agitador magnético em banho maria a 60°C. O pH foi ajustado novamente para 7,5 com NaOH a 3 M, e a amostra foi precipitada em proporção final de etanol 80% gelado por 24 horas e filtrada em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 micrômetros.

As enzimas/proteínas da amostra foram inativadas com 10 volumes (m/v) de clorofórmio:metanol (1:1) em banho-maria a 70°C por 15 minutos. Após centrifugação (10.000 g), o precipitado foi lavado com etanol 80% para retirada

dos monossacarídeos remanescentes e seco com acetona. A amostra que deu origem a FSA ME (fração solúvel em água modificada e extraída) passou pelo processo de extração da parte solúvel em água e, após esta etapa, congelada e liofilizada. A amostra que deu origem a FSA EM (fração solúvel em água extraída e modificada) foi solubilizada em água para passar pelo processo de modificação química. E a amostra que deu origem à FSA (fração solúvel em água) foi liofilizada.

As amostras de pectina de chuchu (FSA, FSA EM e FSA ME), que passaram por este processo, foram testadas com solução de Lugol da Sigma, confirmando a ausência de amido. Como controle positivo foi utilizada uma solução de amido a 3% (amido de batata, Sigma, EUA).

#### **4.1.6 Modificação química (pH) das pectinas dos frutos**

A modificação química das pectinas por alteração do pH quebra as cadeias de carboidratos em cadeias menores, não ramificadas. As unidades mais curtas de polissacarídeos possuem a capacidade de se ligar a galectina-3 em certos tipos de células cancerosas (*Modified citrus pectin-monograph*). Com a intenção de melhorar a solubilidade das pectinas e conseqüentemente os seus possíveis efeitos benéficos a modificação química foi realizada.

As pectinas modificadas foram obtidas empregando-se a metodologia proposta por Staples; Rolke (2013) com adaptações. As amostras foram solubilizadas em água por 24 horas em estufa a 50°C. O pH da amostra foi ajustado para 10 com NaOH 3 M e a amostra ficou durante 1 hora em agitação constante, sendo depois o pH ajustado para 3 com HCL 3 M, sendo que a amostra permaneceu por mais uma hora em agitação constante. O pH foi neutralizado para 7 com NaOH 3 M e a amostra precipitada em etanol 80% (final) durante a noite a 4°C,

foi depois filtrada em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 micrômetros, sendo o precipitado lavado com etanol 80%.

#### **4.1.7 Rendimentos das extrações**

Todas as extrações foram feitas em triplicata técnica para o cálculo dos rendimentos. Optou-se posteriormente pela utilização das amostras liofilizadas, para facilitar o processo de extração ao se trabalhar com volumes menores e aumentar os rendimentos.

## **4.2 Caracterização físico-química dos polissacarídeos**

### **4.2.1 Caracterização das pectinas através da análise de distribuição do peso molecular médio**

Cerca de 5 mg das frações foram pesadas, diluídas em 2 mL de água deionizada e filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . As amostras foram injetadas (25  $\mu\text{L}$ ) e analisadas por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho, acoplada a um detector de índice de refração (HPSEC-RID), usando um sistema 1250 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA). O sistema HPSEC-RID está equipado com quatro colunas PL aquagel-OH MIXED-M (60, 50, 40 e 30; 429 300  $\times$  7,5 mm) (Agilent, Santa Clara, CA). O eluente foi 0,2 M  $\text{NaNO}_3$  a 35 ° C com um fluxo de 0,6 mL - min<sup>-1</sup>. Como padrões, utilizou-se a série Dextran-T de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma-Aldrich, EUA) com tamanhos de 5, 12, 25, 50, 80, 150, 410 e 750 kDa, bem como solução de glicose 1,0% para indicação do volume de permeação total (volume de eluição total).

### **4.2.2 Determinação do teor de proteínas**

A determinação de proteínas foi feita pelo método de Bradford adaptado para detecção de proteínas em microplacas. A análise do teor de proteínas foi feita com o *kit* da *Bio-Rad Protein Assay*, seguindo o protocolo do fabricante para a

realização de ensaio em placa de microtitulação com 96 poços. A curva padrão foi realizada com diluições seriadas de albumina sérica bovina nas seguintes concentrações: 0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 2,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 3,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 3,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 4,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 4,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 5,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Após o período de incubação da placa, com a curva padrão e as amostras, por 10 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 595 nm. O branco analítico foi preparado com água deionizada mais solução corante (*Dye Reagent Concentrate* diluído na proporção de 1:4). A curva padrão foi realizada em quadruplicada e as amostras dos frutos em triplicata técnica.

#### **4.2.3 Detecção de compostos fenólicos livres**

Todas as frações polissacarídicas foram testadas para a detecção qualitativa de compostos fenólicos livres pelo método colorimétrico de com algumas adaptações. A mistura reacional foi de 10  $\mu\text{g}$  das amostras, 15  $\mu\text{L}$  de solução de Folin-Ciocalteu 1N (Sigma, EUA) e 25  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 75g/L. Após o período de incubação de 30 minutos à 37°C, foi feita a leitura da absorvância a 720nm em espectrofotômetro UV-Vis (Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 – BioStack). As análises foram realizadas em triplicata e os cálculos foram baseados na curva padrão de ácido gálico.

#### **4.2.4 Caracterização das pectinas através da composição de monossacarídeos**

Cerca de 2 mg de polissacarídeo solúvel de cada uma das 9 amostras (em triplicata) foram hidrolisados com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA), 2 M a 120 °C por 90 minutos. Após secagem em fluxo constante de nitrogênio gasoso, adicionou-se 1,5 mL de álcool butílico terciário (TBA) e prosseguiu-se novamente com a secagem em nitrogênio com a subsequente ressuspensão em água deionizada e a medição do pH. Esse procedimento foi efetuado repetidamente

até que o pH da amostra atingisse a medição de 6. As amostras foram então filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas pelo sistema HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* – Dionex, EUA) equipado com coluna de troca iônica CarboPac PA10 de 250 mm X 4 mm (Dionex Corp., Sunnyvale, EUA) segundo Shiga et al (2009). As curvas de calibração foram preparadas com a utilização de padrões externos de monossacarídeos (açúcares neutros: fucose, arabinose, ramnose, galactose, glicose, xilose e manose; ácidos urônicos: ácidos galacturônico e glicurônico).

#### **4.2.5 Análise qualitativa dos oligossacarídeos**

As amostras de pectina foram pesadas (1 mg) e diluídas em 1 mL de água destilada e em seguida foram solubilizadas e filtradas em membrana (0,45  $\mu\text{m}$ ). Os oligossacarídeos foram determinados por meio de cromatografia líquida de alto desempenho HPLC-PAD (Dionex™ ICS-5000+ DC), acoplada a um detector amperométrico de pulso (detector ICS-5000+ DC), com bomba ICS-5000 SP e injetor AS-AP (em programa de 40mm de NaOH + 20mm Acetato de sódio, por 8 minutos).

#### **4.2.6 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Grau de Esterificação**

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi usada como ferramenta para caracterizar os polissacarídeos. Foram utilizadas as frações (FSA, FSA EM e FSA ME) liofilizadas dos frutos para determinar o grau de esterificação das amostras. Os espectros foram registrados em um espectrofotômetro ATR-FTIR (Alfa, Bruker, Berlim, Alemanha) com detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS), usando um acessório ATR de salto único (cristal de diamante). Os espectros FTIR-ATR foram obtidos em uma resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Padrões de pectina com graus conhecidos de esterificação



de 0%, 28,5%, 64% e 92% foram obtidos de SIGMA (St. Louis, MO) e amostras de pectinas com graus de esterificação de 14%, 46%, 64%, 78% foram preparadas através da mistura das pectinas já existentes para construir uma curva de calibração, e a partir desses dados obter a equação da reta para analisar o grau de esterificação das pectinas. As amostras foram lidas em triplicata e os espectros foram analisados com o pacote GRAMS / AI (v. 9.1) (Thermo Scientific), sendo que as bandas de interesse se encontraram em torno de 1630  $\text{cm}^{-1}$  e 1749  $\text{cm}^{-1}$  (banda de estiramento de íons carboxílicos e bandas decorrentes de grupos éster carbonilo, respectivamente). Os cálculos foram feitos com base na relação da área:  $A_{1740} / (A_{1740} + A_{1630})$  (MANRIQUE & LAJOLO, 2002; GIL *et al.*, 2016; VRIESMAN & OLIVEIRA, 2009).

#### **4.2.7 Digestão Enzimática**

Cerca de 5 mg de polissacarídeo solúvel de cada uma das amostras FSA ME (modificada e extraída de chuchu, mamão e maracujá) foram diluídas em tampão acetato de sódio 5 mM, pH 4,75. Uma alíquota sem digestão de cada uma das amostras foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No restante das amostras adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de GAL e a solução foi incubada por 1 hora a  $40^{\circ}\text{C}$ , com agitação a cada 10 minutos. O restante das amostras foi dividido em duas alíquotas, sendo que uma parte foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a outra seguiu o processo de digestão com poligalacturonase (Endo Polygalacturonase, Cat no. E-PGALUSP da Megazyme). Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de poligalacturonase na solução, sendo a mistura incubada por 1 hora a  $40^{\circ}\text{C}$  sob agitação a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram aquecidas a  $80^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para interromper a digestão.

Após o término do processo, cada amostra de polissacarídeo modificado deu origem a três tipos distintos de digestão:

1. Amostra sem digestão enzimática;
2. Amostra digerida com GAL;
3. Amostra digerida com GAL e PG.

A Corrida foi realizada com 1mL de água miliQ por minuto e pós coluna de hidróxido de sódio a 1 molar. A temperatura da corrida foi de 25 graus célsius com duração de 40 minutos, sistema HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* – Dionex, EUA) equipado com coluna de troca iônica CarboPac PA10 de 250 mm X 4 mm (Dionex Corp., Sunnyvale, EUA) segundo Shiga et al (2009). As curvas de calibração foram preparadas com a utilização de padrões externos de monossacarídeos (açúcares neutros: fucose, arabinose, ramnose, galactose, glicose, xilose e manose; ácidos urônicos: ácidos galacturônico e glicurônico). As amostras digeridas foram coletadas e liofilizados para análise por RMN.

#### **4.2.8 Caracterização por RMN – Ressonância Nuclear Magnética**

Os espectros de RMN das amostras digeridas de chuchu (FSA ME), mamão (FSA ME) e maracujá (FSA ME) foram registrados usando um espectrômetro Bruker Ascend 500 MHz, com ressonância de sonda tripla, no Instituto de Bioquímica médica (IBqM) na UFRJ. Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram dissolvidas em 0,5 mL de óxido de deutério (d. 99,9%, Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA). Todos os espectros, registrados a 35 ° C com água deuterada, exibiram um pico devido à troca com H<sub>2</sub>O residual (HOD), suprimido por pré-saturação. Para espectros 1D de RMN 1H foram registradas 64 varreduras com atraso de 1s. Os espectros COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*) com acoplamento 1H-1H foram registrados com 64 varreduras, 1024 x 256 pontos e atraso de 1s. Os espectros TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) 1H-1H foram executados com 63 varreduras, 4096 x 512 pontos,

bloqueio de rotação de campo 10 kHz e tempo de mistura de 60 ms. Os espectros HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) 1H-13C foram registrados com 512 varreduras, 2048 x 200 pontos e atraso de 50 ms para evolução de longo alcance, exibidos em relação ao ácido trimetilsililpropiónico externo a 0 ppm por 1H. Os dados foram processados usando o Software TopSpin 3.1 (Bruker Biospin).

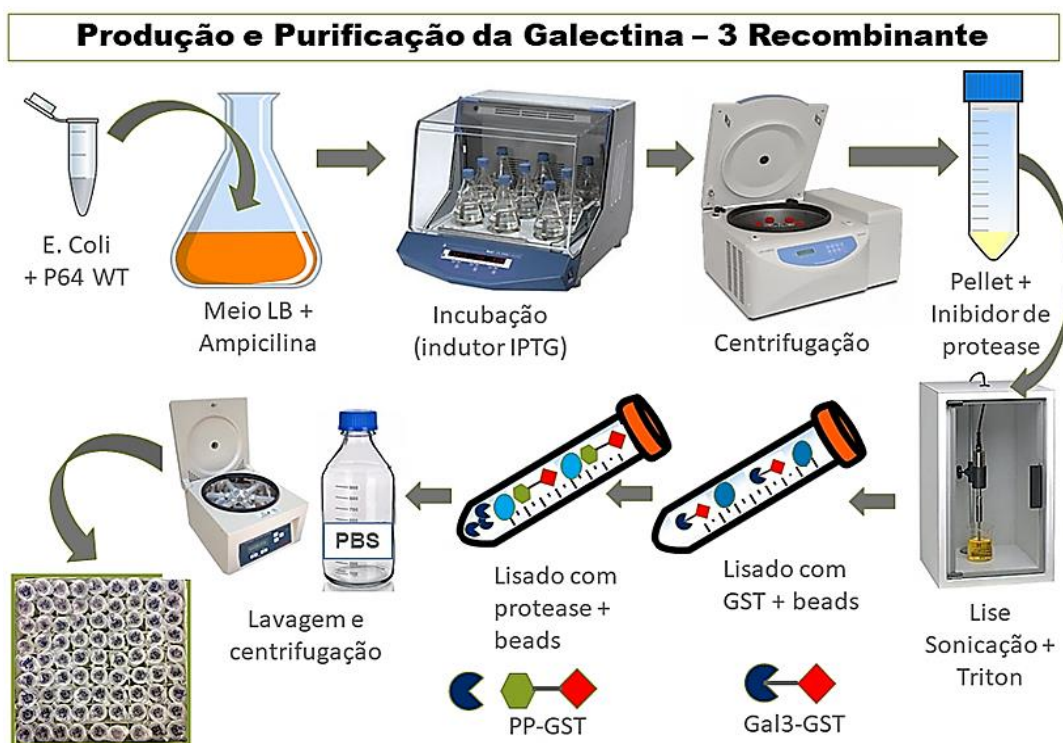
#### **4.2.9 Immuno Dot Blot**

Para o ensaio de *Imunno Dot Blot* foram utilizadas amostras estoques na concentração de 2mg/ml. As amostras foram aplicadas na membrana de nitrocelulose (*Amersham ECL membrane*), seguindo uma ordem decrescente de concentração (20ug/10ug/5ug). A membrana, após sua secagem total, foi incubada durante à noite em tampão de bloqueio (5% BSA em *PBS-Tween* à 0,1%) com os anticorpos primários (LM5, LM16, LM19 e LM20 da Kerafast, Inc.®) em uma diluição de 1:100 (300µl para 30ml de solução). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com *PBS-Tween* e incubada durante a noite com os anticorpos secundários (*Goat Anti-rat Horse Raddish Peroxidase*) em uma diluição de 1:1000 (30µl para 30ml de solução). Após a incubação a membrana foi lavada por 3 vezes com *PBS-Tween* e a leitura efetuada no aparelho Amersham™ Imager 680 da GE. A revelação por quimiluminescência, foi realizada com a solução reveladora do kit Clarity Max™ Western ECL *Substrate* da Bio-Rad Laboratories, Inc., seguindo as instruções da bula.

## **5. ANÁLISES BIOLÓGICAS *IN VITRO***

### **5.1 Análise de afinidade das frações pécticas com a GAL-3 – Ensaio de Hemaglutinação**

Para a realização do ensaio de hemaglutinação se fez necessária a produção de galectina-3 recombinante. Este processo de produção da GAL-3 foi dividido em etapas ilustradas na figura 4 e descritas a seguir: indução, lise bacteriana, purificação, análise qualitativa e análise quantitativa das proteínas recombinantes.



**Figura 4. Esquema simplificado e ilustrativo com as etapas da produção de galectina-3 recombinante.** Gal3-GST, Galectina-3 ligada com o tag de Glutathione-S-transferase; PP-GST, PreScission Protease ligada ao tag de Glutathione-S-transferase.

### 5.1.1 Produção e purificação de galectina-3 recombinante

A GAL-3 está superexpressa em uma variedade de tumores e a análise de suas propriedades geralmente requer o uso de GAL-3 humana recombinante.

A proteína recombinante humana Gal-3 foi produzida segundo Nangia-Makker, Balan & Raz (2013) com algumas adaptações inerentes ao nosso laboratório de pesquisa, e essa produção foi dividida em indução, lise bacteriana e purificação.

A expressão da GAL-3 foi qualitativamente visualizada por SDS-PAGE.

### **5.1.2 Indução**

Células de cepas *E. coli* contendo o plasmídeo P64 WT foram inoculadas em um erlenmeyer contendo 25 mL de meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) e ampicilina (100ug/mL). A suspensão foi mantida sob agitação constante (125 rpm) a 37°C por 24 horas. Foram adicionados mais 500 mL de meio LB e 525 µL de ampicilina (para 100ug/mL de concentração de antibiótico final), e a mistura foi incubada por 4 horas até atingir uma DO<sub>600</sub> (entre 0,6 e 1,0), quando foi adicionado o indutor IPTG em uma concentração final de 0,5 mM (isopropil β-D-1 tiogalactopiranosídeo). A cultura foi incubada sob agitação constante de 125 rpm a 20°C por 24 horas. Alíquotas de 1mL foram coletadas no tempo 0 hora e no tempo 24 horas para análise posterior. Após centrifugação por 20 minutos a 5000 rpm (20°C) o sobrenadante excedente foi descartado. O precipitado de células foi ressuspenso e centrifugado novamente por 15 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado pesado e armazenado a -20°C.

### **5.1.3 Lise bacteriana**

Para cada grama de precipitado bacteriano (pellet), foi adicionado 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS 1x gelado) e 10 µL de um coquetel inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Mix* - GE Healthcare). As bactérias foram lisadas por sonicação (5 ciclos de 1 minuto a 50% de amplitude) no sonicador Branson Digital Sonifier a 4°C. Após a sonicação, foi adicionado 0,01V de Triton X-100 (100 µL, concentração final de 1%) ao tubo. A mistura com Triton ficou sob agitação branda por 30 minutos a 4°C, sendo depois o material transferido para tubos de 15 mL e centrifugados a 15.000 g por 10 minutos, também a 4°C. O sobrenadante com a GAL-3 foi armazenado a -80°C, sendo retirada uma alíquota para análises de qualidade e quantidade posterior, e os restos celulares (debris celular) mantidos a -20°C.

#### **5.1.4 Purificação das proteínas recombinantes**

Para cada 10 mL de material lisado, foram utilizados 500 µL de *Glutathione Sepharose*<sup>®</sup> 4B (GE *Healthcare*) para purificação da GAL-3 através da porção GST (*tag*) presente na construção plasmidial. Em tubos de 15 mL, as *beads* contendo a resina foram adicionadas e centrifugadas por 5 minutos a 500 *g* para descarte do etanol 20% de conservação. Foram colocados 5 mL de PBS 1x e, após ressuspensão, o material foi centrifugado por mais 1 minuto a 500 *g* sendo o sobrenadante descartado e o processo repetido mais duas vezes. O lisado foi colocado em contato pela primeira vez com as *beads* (*Glutathione Sepharose*<sup>®</sup>) em agitação branda por 1 hora a 4°C, em seguida centrifugado a 500 *g* por 10 minutos sendo o sobrenadante retirado e armazenado a 4°C. Posteriormente, foi realizada a lavagem da resina (com a proteína recombinante ligada) com *Cleavage Buffer* (CB) (5 mL de tris-HCl a 1 M com ph 7; 15 mL de NaCl a 1 M; 0,2 mL de EDTA a 0,5M; 1mL de DTT a 0,1M). Uma mistura de 480 µL de CB e 20 µL de *PreScission Protease* (GE *Healthcare*) foi adicionada às *beads* e o material incubado em agitação branda por 1 hora em temperatura ambiente e centrifugado durante 10 minutos a 5000 *g*. O sobrenadante contendo a GAL-3 recombinante já sem o *tag* de GST (mas ainda contendo a protease que contém um *tag* para GST) foi transferido para novas *beads* (*Glutathione Sepharose*<sup>®</sup>) já condicionadas em *Cleavage Buffer* para retirada da protease. Após 1 hora as *beads* foram lavadas com PBS e o material centrifugado por 5 minutos a 500 *g*. O sobrenadante contendo galectina-3 foi coletado e armazenado a -80°C.

#### **5.1.5 Análise qualitativa da expressão da proteína Galectina 3 utilizando SDS-PAGE**

Seguiu-se o protocolo do livro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Green & Sambrook, 2010) para gel de eletroforese com poliacrilamida com gel de

resolução à 10%. A preparação de amostras com precipitado bacteriano foi feita com a adição de *Loading buffer* (tris-HCL a 1M com pH 6,8; SDS; bromofenol azul; glicerol; água deionizada) e DTT (dithiothreitol) 1M, posteriormente sendo aquecidas até 99°C em termobloco por 10 minutos para desnaturação total das proteínas.

Após a corrida, as bandas proteicas foram visualizadas através da coloração com Comassie Brilliant Blue R-250 0,1% em metanol 30% e ácido acético 10% (v/v) por 1 hora, e posterior descoloração do gel com uma solução de isopropanolol (etanol 40%; ácido acético 10%; água q.s.p.).

#### **5.1.6 Análise quantitativa das proteínas recombinantes**

A quantificação das proteínas recombinantes foi feita com o BCA Kit da Thermo Fisher Scientific, e a curva-padrão foi preparada com base nas diluições sugeridas pelo fabricante. As concentrações finais para a curva foram de 25µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL, 1000µg/mL, 1500µg/mL e 2000µg/mL com a proteína padrão (albumina) fornecida pelo kit.

#### **5.1.7 Ensaio de Hemaglutinação**

As frações pépticas FSA, FSA EM e FSA ME foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da GAL-3, com a utilização de proteínas recombinantes produzidas segundo Nangia-Makker, Balan & Raz (2013). O estudo da possível interação da GAL-3 com determinados ligantes foi realizado através do teste de inibição da hemaglutinação conforme Ogawa et al. (1995) e Gong et al. (1999), com algumas modificações. Nos ensaios, as células sanguíneas de coelho (obtidas comercialmente) entraram em contato com:

- Água esterilizada (controle negativo);
- GAL-3 recombinante (controle positivo 1);

- GAL-3 recombinante e  $\beta$ -lactose (Sigma), ligante com alta afinidade pela GAL-3 (controle positivo 2);
- GAL-3 recombinante em conjunto com as frações pécnicas dos frutos.

A hemaglutinação não deve ocorrer no controle negativo e no controle positivo 2 (com a Lactose), devendo ocorrer no controle positivo 1. Sendo assim, com os parâmetros negativos e positivos estabelecidos, as frações pécnicas provenientes das polpas dos frutos foram analisadas quanto à inibição da hemaglutinação e a consequente interação com a GAL-3. As possíveis interações que podem ser vistas neste ensaio estão esquematizadas na fig. 5.

Os eritrócitos de coelho foram preparados a partir de 5 mL de sangue fresco recebidos diretamente do produtor e adicionados de 1mM de EDTA para inibição da coagulação. Os eritrócitos foram lavados quatro vezes com PBS e uma vez com 5mL de solução de NaCl a 0,15 M. Após a última lavagem, retirou-se a fração do plasma e dos leucócitos, e o pellet de hemácias foi ressuspendido em *Trypsinization Solution* (0,1M NaPi - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,05M NaCl + tripsina cristalizada 1mg/mL) formando uma suspensão de eritrócitos a 4% que foi incubada durante 1 h a 37 °C. As células tratadas com tripsina foram lavadas 4 vezes com 5 mL de NaCl 0,15 M e fixadas em 5 mL de PBS 0,02 M pH 7,4 contendo 1% de glutaraldeído durante 1 h à temperatura ambiente. A fixação de glutaraldeído foi terminada pela adição de 25 mL de glicina 0,1 M em PBS, pH 7,4 a 4 °C e os eritrócitos fixos foram armazenados em PBS contendo 0,02% de azida sódica. Os ensaios de hemaglutinação foram efetuados em placas de 96 poços com fundo cônico. A mistura reacional continha 25  $\mu$ L de suspensão de eritrócitos a 4% com diferentes concentrações de GAL-3 (realizada primeiramente para determinação da concentração mínima de GAL-3 para se atingir a hemaglutinação) em tampão PBS contendo BSA 1% (albumina sérica



bovina) e diferentes concentrações de lactose e das frações pécicas analisadas.

A inibição da hemaglutinação foi avaliada após 2 horas.





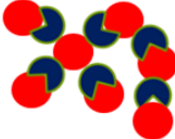





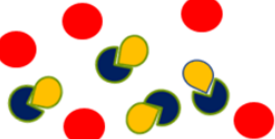

<b>Componentes</b>	<b>Interação</b>	<b>Resultados</b>
Hemácias 		Sem Reação (-) 
Hemácias + <u>Galectina</u> 		<u>Hemaglutinação (+)</u> 
Hem. + Gal 3 + <u>Lac.</u> 		Inibição da <u>Hemaglutinação</u> 
Hem. + Gal 3 + Pec. 		Inibição da <u>Hemaglutinação</u> 

Figura 5. Possíveis interações no ensaio de inibição da hemaglutinação.

## 5.2 Tratamento de células humanas com as pectinas das frutas

### 5.2.1 Cultivo e tratamento das células

As células utilizadas nos experimentos são derivadas de adenocarcinoma epitelial colorretal humano (linhagem HT-29) e de carcinoma colorretal humano (linhagem HCT-116) com alta produção de GAL-3, o que caracteriza essas linhagens como sendo altamente proliferativas gerando um alto grau de metástases. Tais linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ) em importações das células diretamente do *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, EUA). Três diferentes passagens para cada tipo de células foram utilizadas como representação de triplicata biológica. Além disso,

uma triplicata técnica de cada passagem foi efetuada (somando-se uma nonaplicata). As linhagens celulares foram cultivadas em “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*” – DMEM (HT-29, HCT-116) contendo penicilina (100 µL / mL), estreptomicina (100 µg / mL) e 10% de sorofetal bovino (FBS), em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento das linhagens foi monitorado periodicamente e o meio de cultura trocado a cada dois dias. Ao atingir 90% de confluência as células (aderentes) foram desprendidas das placas de crescimento, usando tripsina/ EDTA e utilizadas nos ensaios descritos a seguir.

### **5.2.2 Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (redução do MTT)**

A viabilidade celular foi mensurada através da redução do composto MTT ([brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas. Ao ser reduzido o MTT é convertido em cristais de formazan, um composto de coloração azul-escuro não solúvel em água. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1,0 x 10<sup>4</sup> células/poço - 200 µL) durante a noite. Posteriormente as células foram incubadas na presença das frações das pectinas de chuchu, mamão e maracujá, em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL) e em intervalos de 24, 48 e 72 horas. Após a incubação, adicionou-se MTT (0,5 mg / mL) em meio de cultura durante 3 horas. Os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 150 µL de DMSO puro. A absorbância a 490 nm foi medida em um leitor de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA). A viabilidade das células em cada tempo de incubação foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação às células não tratadas (controle 1), além de serem comparadas com as células tratadas com Triton-X (0,2%, controle 2) como controle positivo de morte celular.

### **5.2.3 Análise de citotoxicidade (LDH)**

Foi realizado um ensaio colorimétrico de LDH, Lactato Desidrogenase, para análise da citotoxicidade das pectinas testadas nas linhagens celulares HCT 116 e HT 29. A Lactato Desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante foi avaliada usando o Kit de Detecção de Citotoxicidade PLUS (LDH) da Roche Diagnostics e um espectrofotômetro de microplacas, de acordo com instruções do fabricante. As células (linhagens HCT 116 e HT 29), foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após incubação de 24 horas, os tratamentos com os polissacarídeos na concentração de 2% e os controles (branco, baixo, alto e Triton-X) foram adicionados. Após 24 horas, os sobrenadantes (100 µL) foram misturados com a solução de substrato e incubados a 25 ° C por 25 minutos protegidos da luz e, em seguida, foi adicionada uma solução de parada e a absorbância medida a 490 nm num leitor de microplacas (Bio-Rad). A citotoxicidade (%) das amostras foi expressa como a quantidade de LDH liberada quando comparada com a quantidade de LDH liberada pelas células tratadas com uma solução de lise, controle alto.

### **5.2.4 Análise da distribuição das fases do ciclo celular através da citometria de fluxo**

Os tratamentos que resultaram em um perfil de inibição de crescimento (FSA EM e FSA ME) foram analisados por citometria de fluxo, com a utilização do BD Cycletest Plus DNA (Becton, Dickison and Company, BD Biosciences, San Jose, CA 95131 USA, REF 340242, LOT 5189694), seguindo as orientações do fabricante. Para tanto, as células tratadas foram coradas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo, sendo possível verificar um histograma da frequência do conteúdo de DNA, a fim de se observar as diferentes fases do ciclo celular. As células HCT116 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na

quantidade de  $1,0 \times 10^6$  células por poço e incubadas durante a noite para promover a aderência, sendo depois tratadas com os polissacarídeos (1,0 mg/mL – 1%) e com os controles, Branco (apenas células) e DMSO por 24, 48 e 72 h. Todos os sobrenadantes foram transferidos para tubos de citômetro e os poços lavados delicadamente com PBS. As células foram tripsinizadas e transferidas para os respectivos tubos de citômetro com a adição de PBS. Os tubos com as células foram lavados 2 vezes com solução tampão e centrifugados por 5 minutos a 300g para sedimentação. Após a lavagem final, as células foram contadas com a utilização um hemacitômetro para o ajuste da concentração celular ( $1,0 \times 10^6$  células / mL). As células foram coradas de acordo o procedimento sugerido pelo fabricante do kit, e filtradas em malha de *nylon* para análise no citômetro de fluxo da BD Biosciences (BD FACSVerser™ Universal Loader). Os ensaios de ciclo celular foram realizados de forma independente com triplicatas biológicas e quantificados com o software FlowJo (versão 10.0.7, Ashland,OR, EUA).

#### **5.2.5 Detecção de Apoptose através da citometria de fluxo**

As células (HCT116 e HT29) foram plaqueadas em placas de cultivo celular com 24 poços, a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço (1 mL) e incubadas durante a noite. Em seguida, os tratamentos (frações FSA ME na concentração de 1,0 mg/mL) e os controles DMSO e Triton-X em meio de cultura foram adicionados e incubados por 24 h. A apoptose foi avaliada com a utilização do *PE Annexin V Apoptosis Detection KIT I* (Cat 559763 - BD Biosciences, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado com 2% de BSA e depois ressuspendidas com tampão de ligação (*Annexin V binding buffer*) a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. As soluções de  $1 \times 10^5$  células (100 mL)

foram transferidas para tubos de citômetro. Para coloração das células, adicionou-se aos tubos *Annexin V* da FITC (5 µL) e 7AAD (5 µL). As soluções foram homogeneizadas suavemente no vórtex e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente (25 ° C), no escuro. Finalmente, 400 µl de *Binding Buffer* 1X foram adicionados a cada tubo, e as amostras analisadas por citometria de fluxo dentro de 1 hora, usando um citômetro de fluxo da BD *Biosciences* (BD *FACSVerse™ Universal Loader*). Os controles de células não coradas e coradas apenas com *Annexin V* ou 7AAD da FITC foram usados. A análise dos dados foi realizada com o *software* FlowJo (versão 10.0.7, Ashland, OR, EUA). Apenas as amostras FSA ME dos frutos foram analisadas, em virtude dos resultados obtidos nos ensaios proliferação celular.

## **6. Parâmetros Gênicos**

### **6.1 Análise de biomarcadores genéticos (PCR em tempo real)**

Determinados biomarcadores genéticos tiveram a sua expressão analisada utilizando a PCR quantitativa em tempo real (*qPCR*) nas amostras de células (HCT 116 e HT 29) que apresentaram significativas mudanças de crescimento após o tratamento com as pectinas do chuchu, maracujá e mamão. Os genes analisados por *qPCR* foram aqueles relacionados com a apoptose, regulação, migração, diferenciação e proliferação celular (TGFβ1, interleucina-1, MMP-9, EGF, HADC5, HADC1, CCNB1IP1, NFKB1, MTOR, CDH1, TNF, RIPK1, BCL2 e MLKL). Os três genes controles para normalização dos experimentos foram os das enzimas UCHL5 (ubiquitina C); GPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e ACTB (beta actina).

Os experimentos seguiram as informações para *qPCR* de acordo com MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR*

*Experiments*). O RNA das células foi extraído usando o Pure link™ RNA Mini kit (REF 12183025, LOT 1905568, *ambion by life Technologies 5791 Van Allen Way Carlsbad CA 92008*) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi purificado para retirada de DNA remanescente usando o *DNA-free Kit - invitrogem* By Thermo Fisher Scientific (LOT 00478285, REF AM1906 - Thermo Fisher Scientific Baltics UAB V.A. Graiciuno 8, LT-02241 Vilnius, Lithuania) com emprego de DNase e a qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A quantificação do RNA foi feita no nanofotômetro da Implen em nanogramas por microlitro (NanoPhotometer N60/N50) com relação de absorvância A260 / A280 entre 1,9 e 2,0. Os géis de agarose a 1% e a quantificação do RNA foram feitas antes e depois da purificação do material com o DNA-free Kit. A síntese de cDNA foi realizada utilizando *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (LOT 00566824 - Thermo Fisher, Scientific Baltics UAB) e a validação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real usando a metodologia TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) no equipamento QuantStudio 7 (Thermo).

Os *amplicons* em nonoplicata (de cada triplicada biológica foi feita uma triplicata técnica), resultantes das reações de PCR foram sequenciados e os resultados, expressos em valores de CT, calculados e comparados segundo o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak et al. (2001).

A representação dos resultados obtidos através da nonoplicata de análise foi feita como média  $\pm$  SEM e realizada pelo programa Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA). A estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* ANOVA com o teste de Dunnett, que avalia diferenças entre o grupo controle e os demais grupos.

## Fluxo de Trabalho - qPCR - TaqMan®



**Figura 6. Representação resumida com ilustrações das etapas de trabalho para a realização do qPCR.** A imagem fornece informações sobre os métodos e kits utilizados nos ensaios.

### 7. Análise Estatística

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de pelo menos três experimentos, salvo indicação contrária indicada na legenda das figuras. A análise foi realizada no *software* Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA), utilizando ANOVA unidirecional com Dunnett (para avaliar diferenças entre o controle e dois ou mais grupos) testes. A significância foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Teor de água dos frutos e rendimentos das extrações

O teor da água dos frutos (medido em porcentagem através da relação do peso dos frutos antes e após a liofilização) e o rendimento das extrações foram calculados a fim de otimizar o processo de extração dos polissacarídeos. A escolha por se trabalhar com amostras liofilizadas foi em função dos rendimentos obtidos serem maior, facilitando assim o processo de extração. Os resultados de teores de água estão condizentes com os descritos na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA – FCF-USP). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas das amostras.

**Tabela 1. Teor de água dos frutos**

<b>Chuchu</b>	93,42% $\pm$ 0,63
<b>Mamão</b>	89,17% $\pm$ 0,37
<b>Maracujá</b>	90,89% $\pm$ 1,86

Dados representados como média em porcentagem  $\pm$  desvio padrão de triplicatas das amostras.

**Tabela 2. Rendimentos das extrações em relação à massa de fruto utilizado**

	<b>Chuchu</b>	<b>Mamão</b>	<b>Maracujá</b>
1ª extração	31,09 $\pm$ 1,26	26,33% $\pm$ 0,49	53,25% $\pm$ 5,54
FCT			
2ª extração	29,16 $\pm$ 2,28	34,61% $\pm$ 1,26	61,56 $\pm$ 0,52
FCT			
3ª extração	24,77% $\pm$ 0,02	7,44% $\pm$ 0,03	17,54% $\pm$ 0,03
FSA			

(FCT – Fração Celular Total, FSA – Fração Solúvel em água)

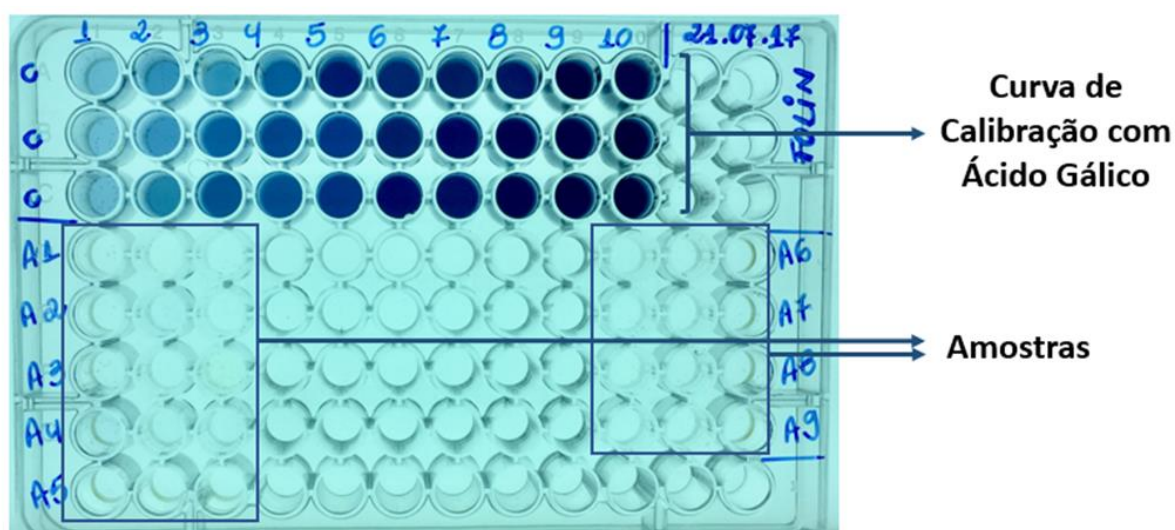
Dados representados como média em porcentagem  $\pm$  desvio padrão de triplicatas das amostras.



## 8.2 Caracterização as amostras de polissacarídeos com relação a presença de compostos fenólicos livres e proteínas

Todas as frações polissacarídicas foram testadas pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos na leitura da placa demonstraram valores de absorbância menores do que o limite de detecção do método, e isso se deve ao fato da não detecção de compostos fenólicos livres em nenhuma das amostras testadas (figura 7).

Todas as amostras de polissacarídeos dos frutos foram lavadas com 3 volumes de clorofórmio:metanol para inativação proteica. Mesmo assim, a análise da presença de proteínas, pelo método de Bradford, foi realizada para garantir que as referidas amostras não continham contaminantes que pudessem interagir com as células utilizadas nos ensaios do estudo. A partir dos valores de absorbância obtidos na análise, não foi detectada a presença de proteínas em nenhuma amostra (figura 8). Os dados obtidos na leitura das amostras se encontraram abaixo do limite de detecção do método (faixa de medição linear do ensaio, 0,05 mg/mL até 0,5 mg/mL).

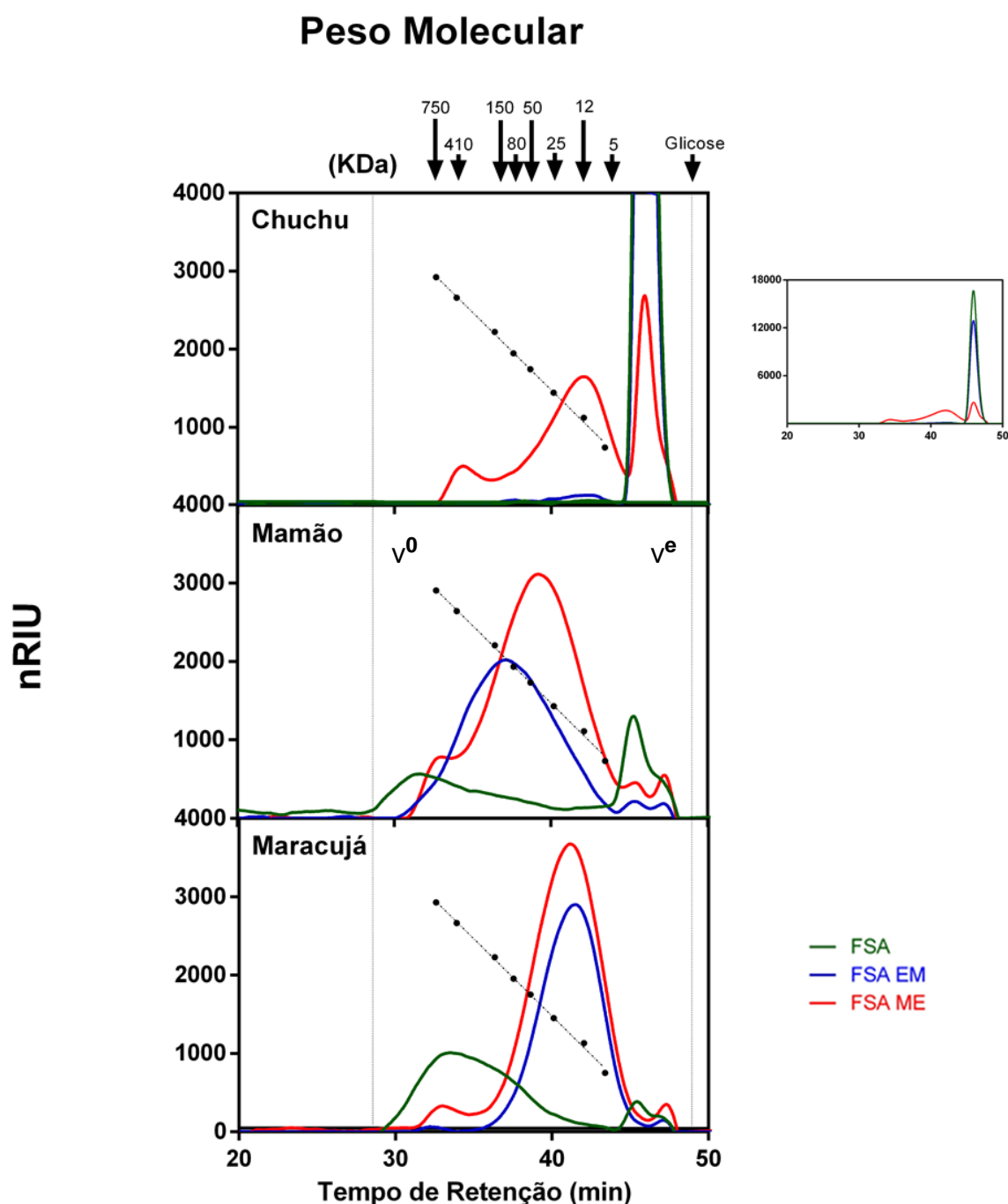


**Figura 7. Microplaca de 96 poços utilizada para análise de teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu.** Nas três primeiras linhas (A, B e C) a curva de calibração com ácido gálico em triplicata. Amostras de A1 a A9 em triplicata: A1 - FSA de chuchu, A2 - FSA de mamão, A3 - FSA de maracujá, A4 - FSA ME de chuchu, A5 - FSA ME de mamão, A6 - FSA ME de maracujá, A7 - FSA EM de chuchu, A8 - FSA EM de mamão e A9 - FSA EM de maracujá.

### **8.3 Efeitos da modificação química no perfil e composição das frações pécnicas de chuchu, mamão e maracujá**

#### ***8.3.1 Efeitos na distribuição de peso molecular***

As distribuições de peso molecular dos polissacarídeos, obtidas pelo sistema HPSEC-RID, foram analisadas pelo programa GraphPad Prism, e de acordo com os tempos de retenção obtidos para cada padrão utilizado, obteve-se a seguinte equação da reta:  $y = - 5,0587x + 64,409$  ( $R^2 = 0,998$ ). A partir dos cromatogramas obtidos das amostras analisadas e aplicação dos valores dos tempos de retenção para cada pico em respectiva equação da reta foi possível calcular os valores de peso molecular para as frações de polissacarídeos (figura 8).



**Figura 8. Caracterização das pectinas através da distribuição do peso molecular médio pelo sistema HPSEC-RID (High Performance Size Exclusion Chromatography with Refractive Index Detector – Agilent, USA).** Na imagem podemos ver a sobreposição dos cromatogramas por exclusão de tamanho, o perfil cromatográfico das amostras está representado em conjunto com a regressão linear (reta pontilhada) obtida a partir dos padrões moleculares utilizados na análise.  $V_0$ : Volume de exclusão total (volume morto);  $V_e$ : Volume de Permeação Total (volume de eluição). As frações de pectina quimicamente modificadas mostraram uma diminuição do peso molecular aparente, o que poderia favorecer o aumento de sua atividade biológica. O gráfico de HPSEC do chuchu está apresentado com escala igual aos outros gráficos para fins comparativos. Ao lado dele, um gráfico está representado com a escala completa para visualização completa de todos os picos.

Na tabela abaixo, estão representados os valores individuais dos pesos moleculares referentes aos picos das amostras:

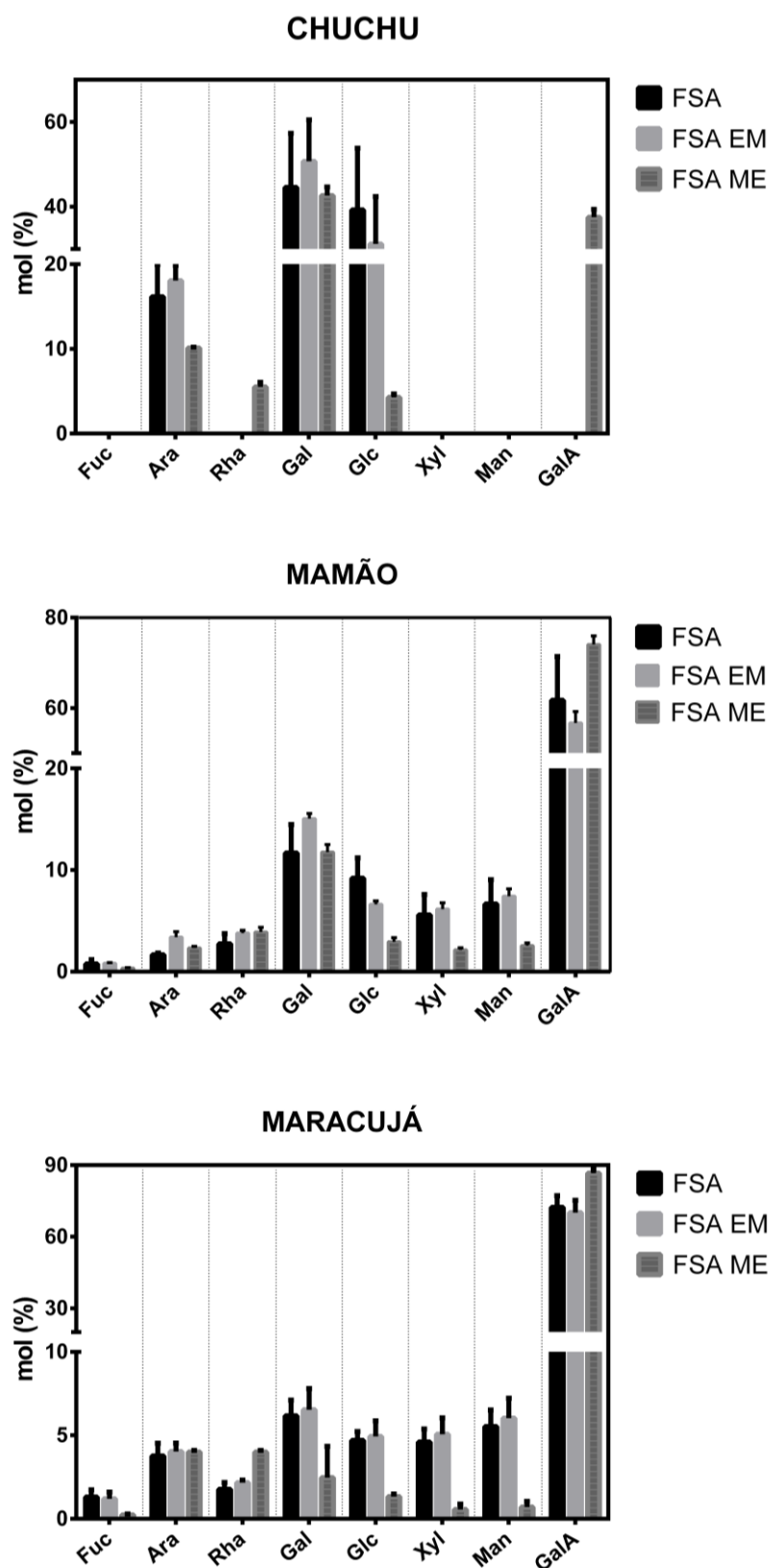
<b>Tabela 3. Valores dos pesos moleculares das frações de polissacarídeos solúveis em água de chuchus, mamões e maracujás</b>		
<b>Chuchu</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Peso Molecular (KDa)</b>
FSA Pico 1	45,943	4
FSA EM Pico 1	45,945	4
FSA ME Pico 1	34,398	>750
FSA ME Pico 2	42,078	25
FSA ME Pico 3	45,965	4
<b>Mamão</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Peso Molecular (KDa)</b>
FSA Pico 1	31,605	>750
FSA Pico 2	45,275	5
FSA EM Pico 1	37,129	243
FSA EM Pico 2	45,342	6
FSA EM Pico 3	47,178	2
FSA ME Pico 1	33,026	>750
FSA ME Pico 2	39,202	94
FSA ME Pico 3	45,373	6
FSA ME Pico 4	47,246	2
<b>Maracujá</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Peso Molecular (KDa)</b>
FSA Pico 1	33,498	>750
FSA Pico 2	45,431	5
FSA EM Pico 1	32,257	>750
FSA EM Pico 2	41,479	33
FSA EM Pico 3	47,1	3
FSA ME Pico 1	33,023	>750
FSA ME Pico 2	41,179	38
FSA ME Pico 3	42,288	2

Observa-se uma diferença entre os tempos de retenção das amostras de pectina modificadas quimicamente (FSA EM e FSA ME) e das não modificadas (FSA). A técnica empregada no processo de hidrólise química das pectinas se mostrou eficaz pois se observou uma diminuição do peso molecular aparente dos

polissacarídeos. O objetivo de diminuir o peso molecular, para aumentar a solubilidade das amostras modificadas, foi alcançado, mesmo sem que nenhum teste biológico específico tenha sido realizado.

### ***8.3.2 Diferenças na composição dos monossacarídeos e análise de oligossacarídeos***

A determinação da composição de monossacarídeos auxilia no entendimento das possíveis relações entre a estrutura e a atividade biológica das diferentes frações pécticas, com relação à inibição da hemaglutinação e manutenção da viabilidade celular após os tratamentos. Os dados da análise da composição de monossacarídeos estão representados a seguir (média  $\pm$  desvio-padrão), em gráfico de barras (figura 9).



**Figura 9.** Caracterização das pectinas através da composição de monossacarídeos pelo sistema HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection – Dionex, EUA). Gráfico em barras dispendo os valores obtidos em % (mol) para cada monossacarídeo constituinte das amostras analisadas. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas.

Na análise dos resultados, observa-se que a composição de monossacarídeos foi diferente entre as amostras (FSA, FSA EM e FSA ME). As quantidades de GalA (ácido galacturônico) e Rha (ramnose) aumentaram nas frações que sofreram hidrólise antes da extração com água (FSA ME), liberando, provavelmente, uma maior quantidade de pectinas ácidas (homogalacturonanos) nestas amostras.

Segundo LECLERE *et al.*, 2013, até agora, três polissacarídeos pécticos principais foram identificados em parede de plantas cujas atividades biológicas foram atribuídas. São homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos-I (RG-I) e galacturonanos substituídos (GS).

O homogalacturonano constitui cerca de 65% da molécula de pectina e é uma cadeia linear de ácido galacturônico (GalA). O ramnogalacturonano-I corresponde a 20-35% da pectina, e sua cadeia principal é uma repetição de dissacáridos compostos por ácido galacturônico e ramnose, com cadeias laterais (lineares ou ramificadas) de galactose e arabinose.

Com relação aos dados obtidos na composição de monossacarídeos do chuchu verde, ao compararmos esses resultados com os estudos apresentados por SHIGA *et al.*, 2015, podemos observar uma certa reprodutibilidade de composição de monossacarídeos, mas com uma principal diferença nas quantidades de ácido galacturônico.

**Tabela 4. Comparação da composição de monossacarídeos do chuchu entre estudos\***

	<b>FSA (SHIGA et al., 2015)</b>	<b>FSA (atual)</b>	<b>FSA EM (atual)</b>	<b>FSA ME (atual)</b>
Rha	0,7%	0	0	5%
Fuc	0,4%	0	0	0
Ara	31%	16%	18%	10%
Xyl	3%	0	0	0
Man	7%	0	0	0
Gal	31%	44%	50%	42%
GalA	9%	0	0	37%
Glic	15%	39%	31%	4%
GlicA	4%	0	0	0

\*Os valores apresentados são as médias das porcentagens de molaridade.

Analisando a tabela acima, podemos concluir que a amostra FSA ME de chuchu apresentou um incremento de ácido galacturônico (GalA) e de ramnose. Isso pode ser representativo de um aumento nas quantidades de homogalacturonanos e ramnogalacturonanos oriundos da modificação química da fração celular total. Esse aumento pode estar relacionado ao maior efeito biológico desta fração nos ensaios *in vitro*. No trabalho publicado por SHIGA *et al.* (2015), os arabinogalactanos encontrados foram do tipo 2, provavelmente a arabinose e a galactose encontradas nesta pesquisa também estejam relacionadas às estruturas de arabinogalactanos do tipo 2. Essa diferença nos resultados pode estar relacionada às diferenças de frutos, de época cultivada do ano e aos tipos de solo. Mas uma outra hipótese seria o tipo de extração. No

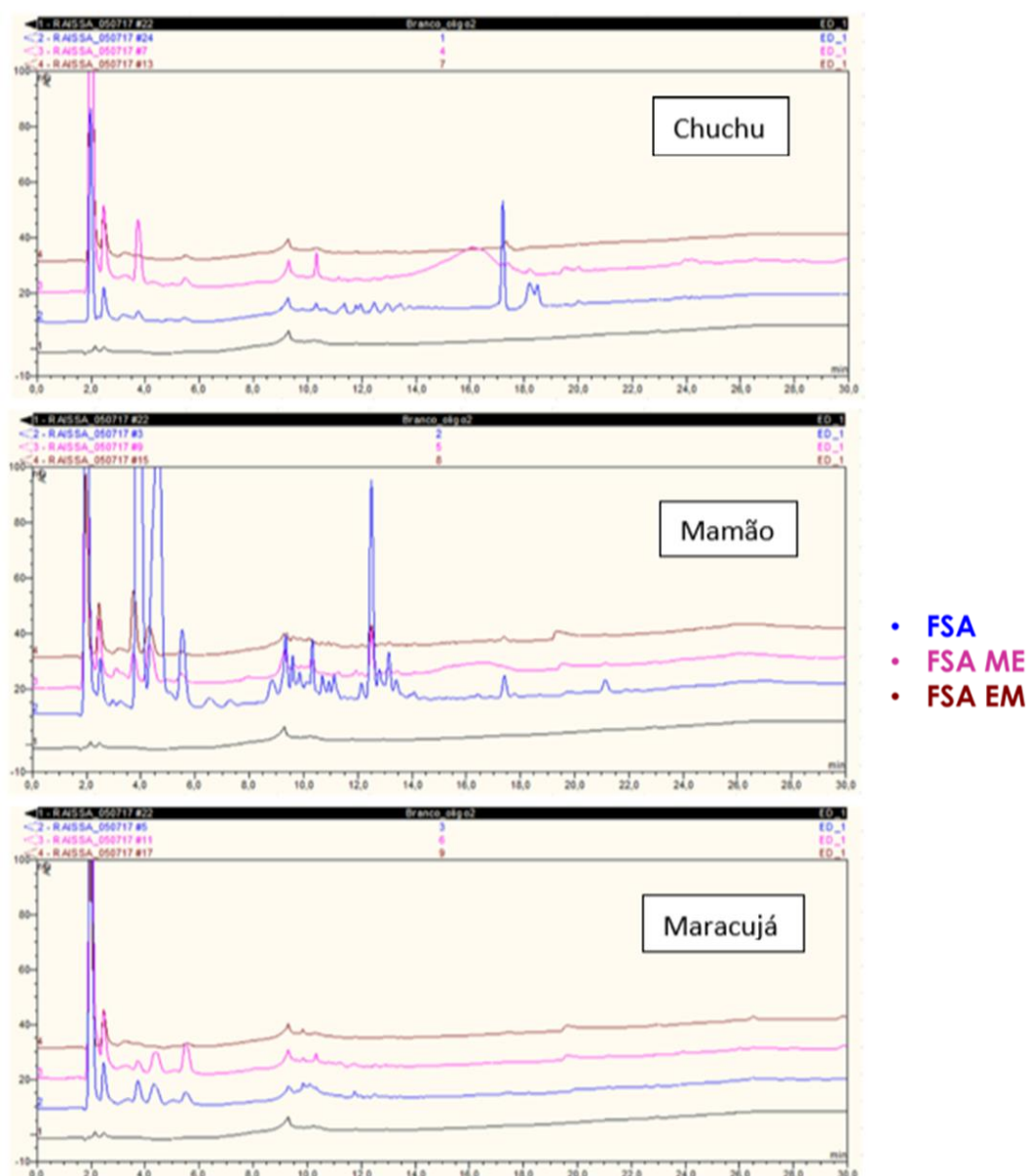


estudo publicado por SHIGA *et al.* (2015), foi feito o cozimento do fruto verde para a liberação de pectina, embora no presente trabalho as amostras sofreram aquecimento até 80°C para a retirada do amido, e somente depois foram extraídas em água à temperatura ambiente.

Nas amostras de mamão as diferenças entre a composição de monossacarídeos das frações foram menores. Segundo PRADO *et al.* (2017), os arabinogalactanos encontrados no mamão também são do tipo 2, o que poderia arremeter a uma mesma estrutura encontrada nos mamões verdes do presente estudo. Entretanto, estudos de análise de ligação devem ser efetuados em todas as amostras para um maior esclarecimento da estrutura química das frações pécnicas.

As modificações físicas, químicas e enzimáticas de polissacarídeos nativos são utilizadas para aumentar a atividade biológica dos mesmos. A hidrólise dos polissacarídeos, além de gerar polissacarídeos de menor peso molecular, também pode gerar oligossacarídeos. Devido a essa provável presença de oligossacarídeos, efetuou-se a análise qualitativa desses oligossacarídeos (figura 10). Nos cromatogramas abaixo, pode-se observar que no processo de modificação das pectinas uma parte dos oligossacarídeos de chuchus e mamões foi perdida, não parecendo ter interferido na atividade biológicas das referidas frações (FSA ME e FSA EM). Entretanto, não se sabe ao certo em qual etapa do procedimento houve a perda dos oligossacarídeos, duas possibilidades podem ser aventadas. A primeira seria que quando se efetuou os tratamentos químicos para diminuição do tamanho molecular dos maiores polissacarídeos, as ligações glicosídicas dos oligossacarídeos também podem ter sido desfeitas, degradando-os a açúcares simples e extraídos pelas lavagens com etanol 80%. Outra razão poderia ter sido que, quando as amostras foram precipitadas com

etanol final em 80%, alguns oligossacarídeos podem não ter sido precipitados adequadamente ou terem sido extraídos nas lavagens subsequentes com etanol 80%. Para as amostras de maracujá, não foram detectados grandes quantidades de oligossacarídeos em nenhuma delas.



**Figura 10. Análise qualitativa de oligossacarídeos por meio de cromatografia de íons de alto desempenho HPLC-PAD.** Na análise dos cromatogramas, podemos observar que no processo de modificação das pectinas uma parte dos oligossacarídeos de chuchus e mamões foi perdida, mas isso parece não ter interferido na atividade biológicas das referidas frações (FSA ME e FSA EM). As amostras de maracujás não apresentaram grandes quantidades de oligossacarídeos.

#### 8.4 Perfil das amostras com relação ao grau de esterificação e FT-IR

O grau de esterificação das pectinas é influenciado pelo solvente e pelas condições de extração utilizadas tais como tempo, temperatura e pH (EMAGA *et al.*, 2008). Para determinar o grau de esterificação das pectinas nas frações FSA, FSA EM e FSA ME dos frutos, as amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (FT-IR).

Pectinas que possuem um grau de esterificação (DE) superior a 50%, são classificadas como ATM (pectinas de alto teor de esterificação), formam gel após aquecimento em soluções com concentração de açúcar superior a 55 % e pH abaixo de 3,5. Abaixo de 50%, são classificadas como BTM (baixo teor de esterificação) e requerem a presença de íons cálcio para formarem gel.

O processo modificação das pectinas influencia diretamente na sua estrutura. A modificação química por alteração do pH pode clivar a pectina de duas maneiras diferentes. Primeiramente por hidrólise ácida (pH <3.0) das ligações glicosídicas ( $\alpha(1\rightarrow4)$ ) e das ligações ésteres dos grupos metil do ácido galacturônico. Pectinas com baixo grau de metoxilação (DM) hidrolisam mais rapidamente as ligações glicosídicas (Krall & McFeeters, 1998). Em segundo lugar, a alteração ocorre em condições alcalinas, através da  $\beta$ -eliminação tanto das ligações glicosídicas quanto dos grupamentos metil. A quebra das ligações glicosídicas por  $\beta$ -eliminação é mais comum em pectinas com alto grau de metoxilação (DM) (Kirtchev *et al.*, 1989; Koubala *et al.*, 2008). Com base nessas informações e observando os valores da Tabela 5, podemos ver que apenas o maracujá apresenta um DE alto. As frações modificadas dos frutos apresentaram uma diminuição do grau de esterificação em comparação com as frações FSA (*in natura*), mostrando que as modificações químicas favoreceram a perda do grupamento metil. Foi verificado também uma diminuição na viscosidade das

soluções, provavelmente decorrente da quebra das ligações glicosídicas. Como nenhum experimento reológico foi efetuado, essa questão não será abordada.

A espectroscopia de infravermelho (FT-IR) é uma excelente ferramenta para análise estrutural e quantitativa de polissacarídeos. Ela foi usada para calcular o grau de esterificação e identificar os comprimentos de onda específicos para discriminar diferentes grupos funcionais das pectinas. Os polissacarídeos são normalmente apresentados em duas regiões específicas:  $1800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  (figura 11). As características dos picos das estruturas das pectinas foram confirmadas com a utilização de pectina cítrica (46% DM). As bandas características das estruturas da pectina foram semelhantes entre os padrões e as amostras, com diferenças nas alturas dos picos dependendo do fruto analisado. As bandas que denotam pectinas são vistas em:  $1746\text{--}1742$ ,  $1617\text{--}1595$ ,  $1242\text{--}1234$ ,  $1016\text{--}1015\text{ cm}^{-1}$  (Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). Os xiloglucanos podem ser verificados em  $1378\text{--}1361$  e  $1149\text{--}1143\text{ cm}^{-1}$  e a celulose em  $894\text{--}893\text{ cm}^{-1}$  (Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). O pico de  $1746\text{--}1742\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento CO de vibração do éster alquílico (pectina não esterificada), o pico  $1617\text{--}1595\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento antissimétrico COO- de grupos ésteres de pectinas, enquanto  $1420\text{--}1411\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao COO- estiramento simétrico (grupo éster de pectina). O pico de  $1331\text{--}1322\text{ cm}^{-1}$  é a vibração do anel de pectina, o de  $1242\text{--}1234\text{ cm}^{-1}$  é a pectina do alongamento CO,  $1146\text{--}1143\text{ cm}^{-1}$  é alongamento assimétrico de pectina O-C-O,  $1098\text{--}1095\text{ cm}^{-1}$  é o alongamento CO e CC da pectina e  $1019\text{--}1014\text{ cm}^{-1}$  também é o alongamento de pectina CO e C sendo  $958\text{--}947\text{ cm}^{-1}$  a flexão CO da pectina.

Picos significativos e característicos das pectinas apareceram em torno de  $1.600\text{ cm}^{-1}$  e  $1.400\text{ cm}^{-1}$  nas amostras de mamão e maracujá, mas não foram muito expressivos nas amostras de chuchu. As várias bandas que aparecem entre

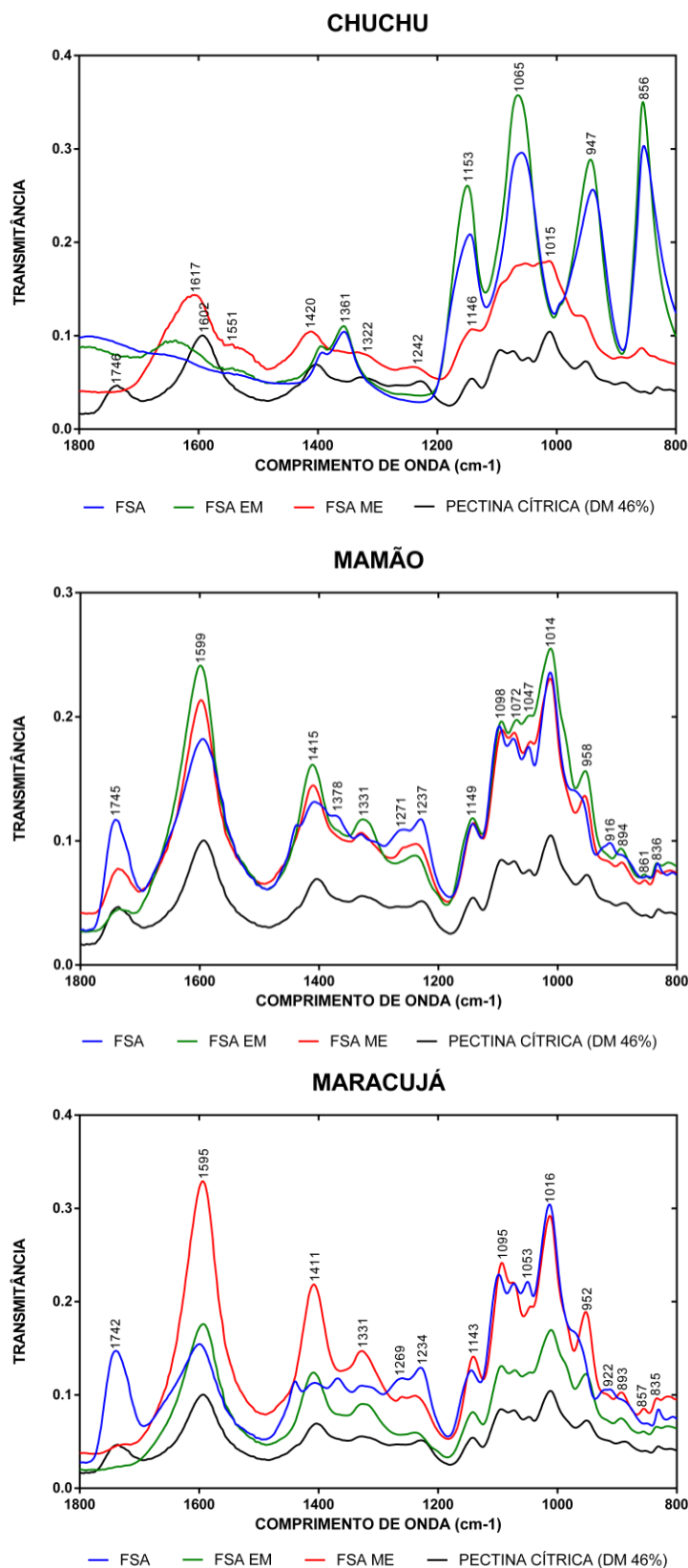
1200-900  $\text{cm}^{-1}$  sugerem a presença de diferentes açúcares neutros. Entre as maiores bandas que ocorreram, em torno de 1019-1014  $\text{cm}^{-1}$  nas amostras de mamão (FSA, FSA EM e FSA ME) e maracujá (FSA e FSA ME) indicam níveis mais altos de homogalacturananos, talvez por isso essas frutas tiveram um maior potencial biológico se comparadas com o chuchu (Cybulska *et al.*,2015).

**Tabela 5.**

**Grau de Esterificação em % segundo equação linear da curva padrão**

	Chuchu	Mamão	Maracujá
<b>FSA</b>	0	47,76 ± 1,91	63,97 ± 4,19
<b>FSA EM</b>	0	23,6 ± 4,16	0
<b>FSA ME</b>	0	30,14 ± 0,45	22,16 ± 1,07

Dados expressos como média em porcentagem ± desvio padrão das triplicatas das amostras e obtidos por Espectroscopia de Infravermelho FTIR-ATR. Algumas amostras não apresentaram pico em uma das bandas de interesse (1630  $\text{cm}^{-1}$  e 1749  $\text{cm}^{-1}$ ), os cálculos com base na área dos picos das respectivas amostras resultou em zero. Equação da reta:  $y = 122,29x + 19,701$ .



**Figura 11. Espectroscopia de infravermelho (FT-IR) de diferentes amostras de pectinas de chuchu, mamão e maracujá.** Espectro por infravermelho de pectinas de citrus com 46% de esterificação (padrão- representado pela cor preta), frações FSA (cor azul), frações FSA EM (cor verde) e frações FSA ME (cor vermelha). Os gráficos foram construídos com a utilização do software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA).

### **8.5 *Immunodot Blot***

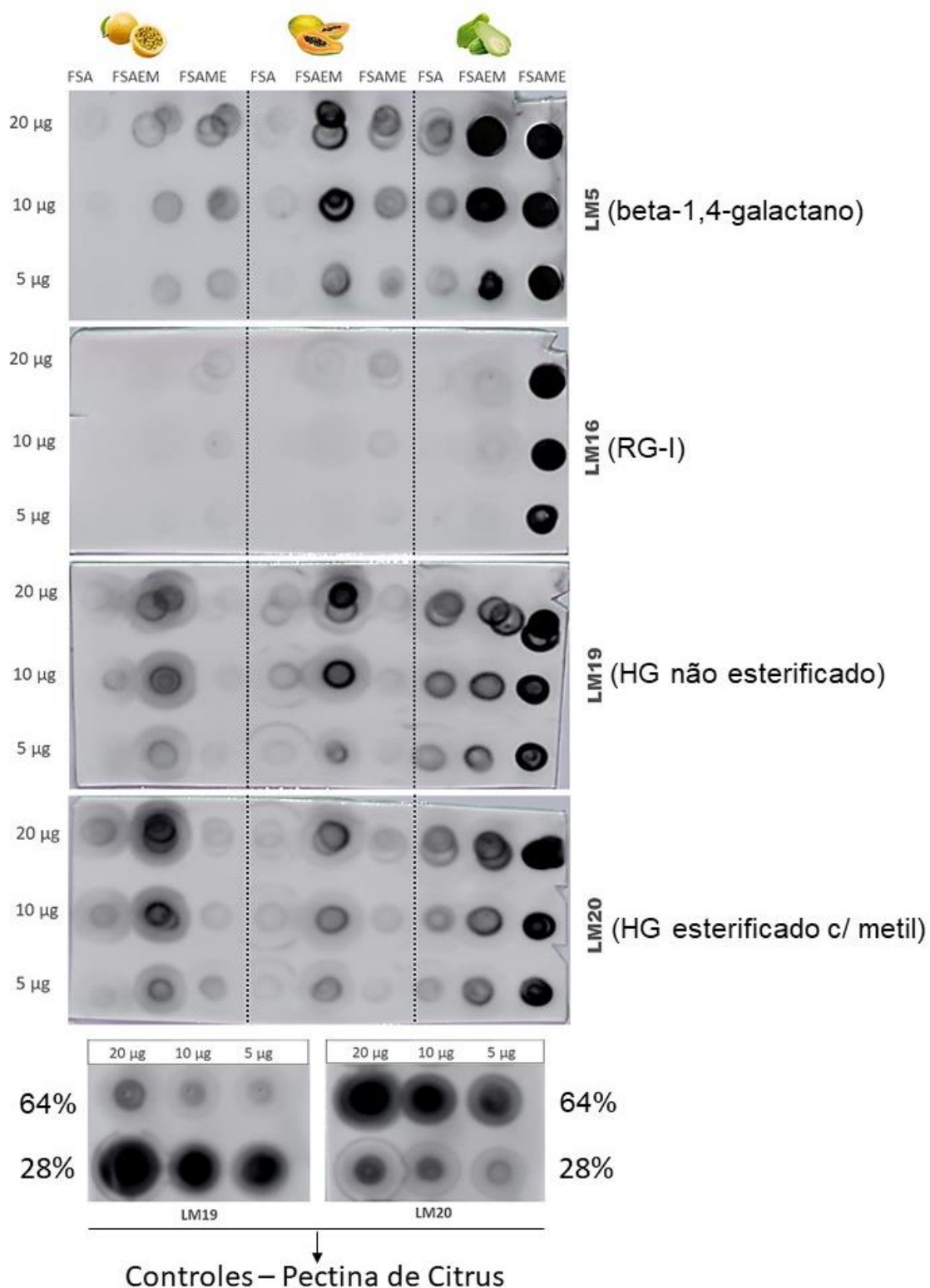
Os anticorpos monoclonais LM5, LM16, LM19 e LM20 foram utilizados como ferramentas moleculares para investigar as ligações específicas na estrutura da parede celular das frações pécnicas dos frutos. O anticorpo LM5 reconhece um tetrassacarídeo linear em (1-4) - $\beta$ -D-galactanos. O anticorpo LM16 reconhece RGI especialmente por epítomos associados aos arabinanos e galactanos. O anticorpo LM19 reconhece o domínio homogalacturonano dos polissacarídeos pécnicos. O anticorpo reconhece uma gama de amostras de homogalacturonanos, mas parece ter uma preferência e se liga fortemente ao homogalacturonano não esterificado. O anticorpo LM20 também reconhece o domínio homogalacturonano dos polissacarídeos pécnicos, mas requer ésteres metílicos para reconhecimento do homogalacturonano e não se liga ao homogalacturonano não esterificado. A ligação ao LM20 é mais efetivamente perdida por tratamentos de alto pH que removem os ésteres metílicos de HG.

A pesquisa com anticorpos do padrão imunológico de domínios de pectina que reconhecem HGs e RG-I, revelou um sinal reduzido em LM16 para todas as amostras, com exceção da amostra FSA ME de chuchu, mostrando que essa razão pode ter, em sua grande maioria, frações pécnicas resultantes de RGI, que foram enriquecidas na modificação química fazendo com que as frações ricas em RGI, menos solúveis em água, fossem solubilizadas devido às quebras de interações intermoleculares e também devido à quebra de ligações glicosídicas e liberação de material de menor peso molecular. As amostras de mamão e maracujá marcaram de forma muito sutil com o anticorpo LM16, não excluindo a possibilidade de se ter frações pécnicas com RGI e arabinanos, porém em menor quantidade em relação às amostras de chuchu FSA ME. Analisando em conjunto os resultados das hibridizações com os anticorpos LM5, pode-se concluir que as

amostras de mamões e maracujás contém RGI com maiores ramificações de galactanos do que arabinanos devido à maior intensidade de hibridização de LM5 em relação ao LM16. Já em relação às amostras de chuchu, observa-se um enriquecimento de RGI com galactanos após o tratamento químico da FSA, e especialmente na amostra FSA ME, observa-se uma solubilização de possíveis novas estruturas outrora insolúveis em água e ricas em RGI com ramificações de arabinanos e galactanos, diferentemente das outras amostras analisadas.

Homogalacturonanos foram reconhecidos pelos anticorpos LM19 e LM20 em todas as frações extraídas dos frutos analisados, mas com resultados conflitantes aos já apresentados. Por exemplo, nas amostras FSA e FSA EM de chuchus, não foram identificados ácido galacturônico na análise de monossacarídeos, mas na análise de hibridização de anticorpos, detectou-se tanto HG metilados como não-metilados, contrariando também a análise por FT-IR, mas corroborando a análise por RMN. Essas divergências das análises podem estar relacionadas à sensibilidade das técnicas analíticas ou ainda diferenças de solubilidade das pectinas, que fazem com que a detecção e/ou identificação de grupos funcionais pelas técnicas analíticas sejam alteradas (quanto menos solúvel, mais difícil a detecção). Através das análises estruturais realizadas, percebemos a importância da presença de cadeias laterais de galactanos juntamente com a cadeia principal de homogalacturonanos para a bioatividade das pectinas.





**Figura 12. Ensaio de Immunodot blot de frações pécnicas dos frutos.** As amostras foram investigadas com LM5 para (1-4) - $\beta$ -D-galactanos, LM16 para arabinanos – RGI, LM19 para HG não esterificado e LM20 para HG esterificado com metil. Os controles foram pectinas de citros com 64% e 28 % de esterificação.

## 8.6 Digestão enzimática

Devido ao fato das amostras modificadas e extraídas (ME) terem apresentado maior atividade biológica nos experimentos *in vitro* (conforme explicado em itens posteriores a essa seção), fez-se necessária uma pesquisa mais aprofundada com relação a caracterização estrutural destas amostras utilizando análise por digestão enzimática específica (item 8.6) e análise por RMN (8.7).

Para verificarmos a presença de HG e RG I nas pectinas modificadas, as enzimas foram escolhidas levando-se em conta a especificidade de atividade:

- A galactanase (endo-1,4- $\beta$ -Galactanase) provoca a endo-hidrólise de ligações de (1,4)  $\beta$ -D-galactose em (1,4)  $\beta$ -galactanos e arabinogalactanos do tipo I dos RGI (figura 13).
- A poligalacturonase (endo Polygalacturonase) atua clivando as ligações  $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 4) dos ácidos galacturônicos não metilados (figura 13).

Nas amostras digeridas com galactanase (Gal) podemos observar um pico considerável de galactose nas amostras de chuchu e mamão e um pico discreto na amostra de maracujá (figura 14), corroborando o que foi verificado na análise de hibridização com o anticorpo LM5. Conclui-se que digestão enzimática induziu a remoção de cadeias laterais de galactanos no RG-I e que essa estrutura está presente nas pectinas estudadas.

Nas amostras digeridas com poligalacturonase podemos visualizar um pico de ácido galacturônico proveniente das porções de HG. Esses picos após a digestão confirmam a presença de HG nas amostras FSA ME dos frutos analisados, confirmando os dados de hibridizações com os anticorpos LM19 e LM20. Sabe-se que a atividade das pectinas depende de suas características estruturais, como a composição das cadeias laterais de RG-I e presença de HG que são suas porções mais bioativas.

## Estrutura e Composição

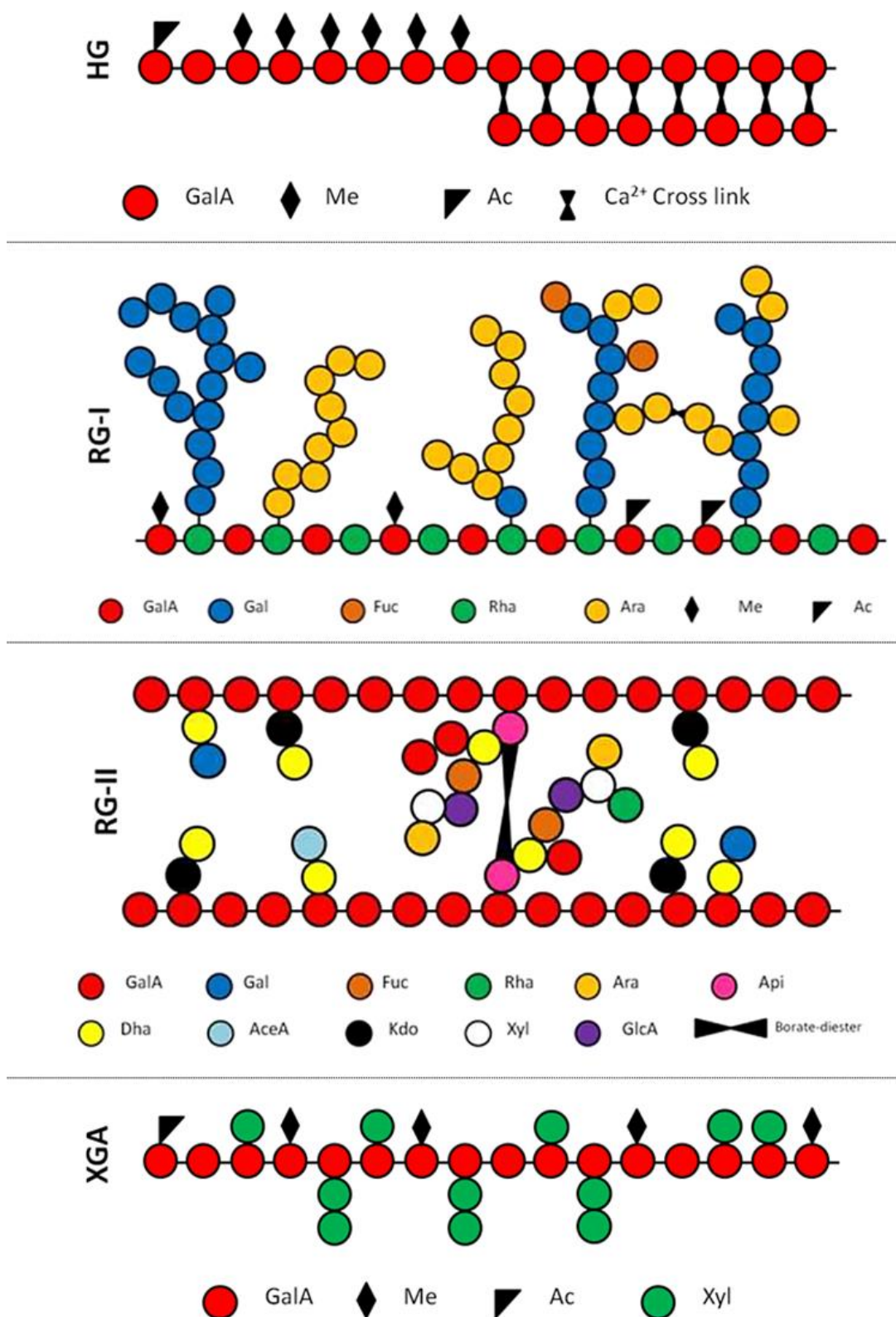


Figura 13. Estrutura e composição do homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI), ramnogalacturonano II (RGII) e xilogalacturonano das paredes celulares das plantas. Figura adaptada de Benians, T. A. S. (2012). In situ analysis of cotton fibre cell wall polysaccharides. University of Leeds.

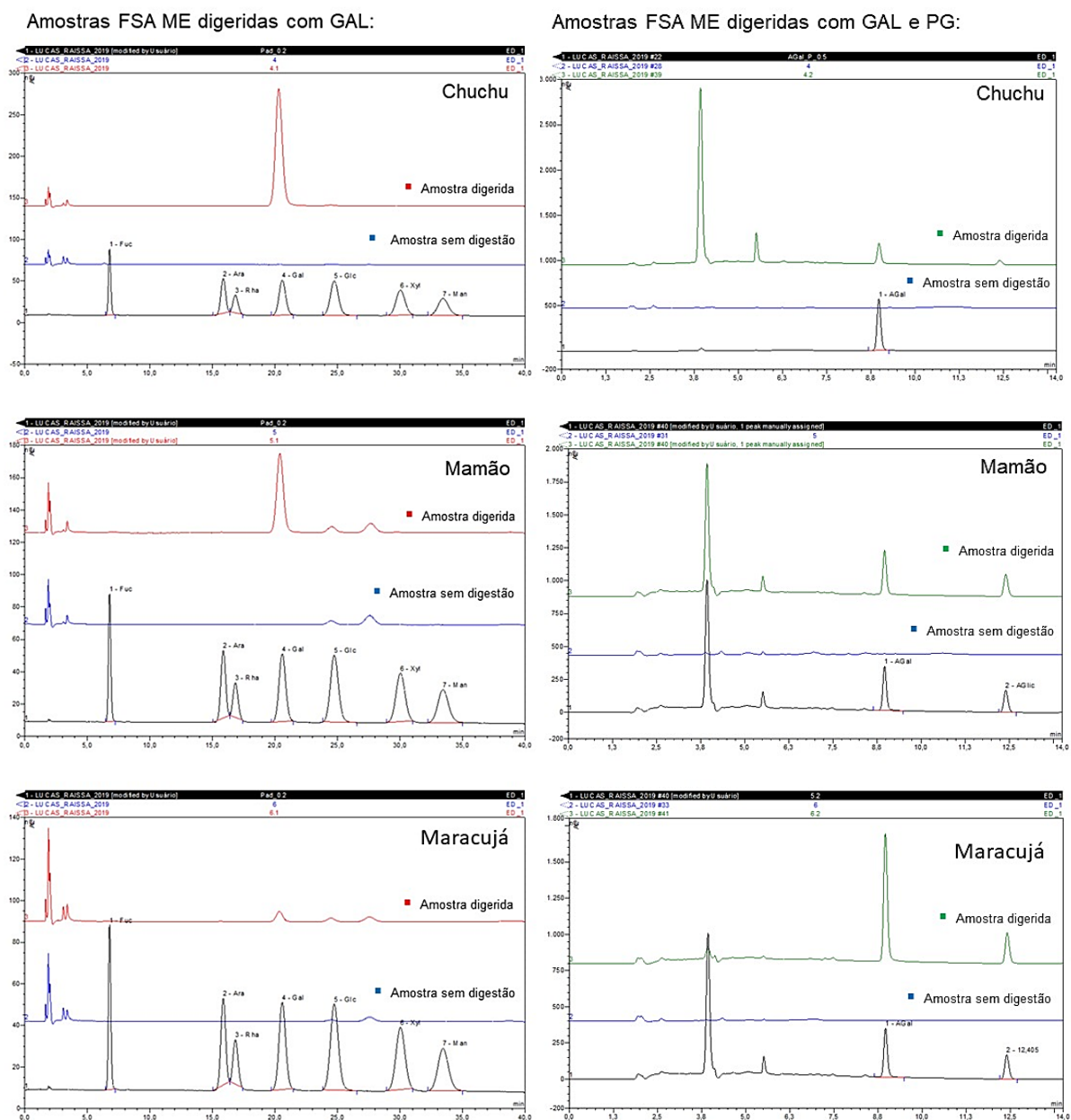
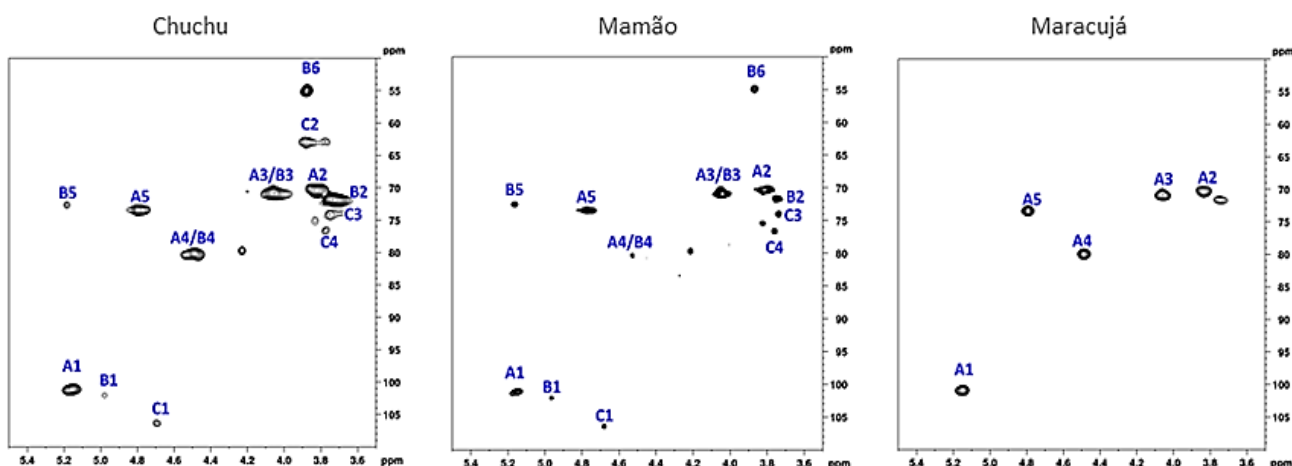


Figura 14. Digestão das pectinas de chuchu, mamão e maracujá (frações FSA ME) com a enzima GAL à esquerda e com GAL e PG à direita.

## 8.7 RMN

As amostras FSA ME (modificada e extraída de chuchu, mamão e maracujá) enviadas para análise de RMN foram previamente tratadas com a enzima GAL (galactanase). A modificação química nessas frações pécnicas (FSA ME) provocou um aumento de ácido galacturônico, observado na análise de monossacarídeos. Um dado controverso foi a detecção de grupos metila nas amostras de chuchu e a baixa detecção nas amostras de maracujá, contrariando os dados de FT-IR para grau de metilação, cujos picos de GalA metilados não foram encontrados para as amostras de chuchu, mas confirmam os dados de hibridização com os anticorpos LM19 e LM20. Isso pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de amostra que é analisada no FT-IR, mesmo replicatas técnicas tendo sido efetuadas em uma mesma amostra. Já a quantidade analisada no RMN é maior. Além disso, não se pode descartar que alterações estruturais podem ter ocorrido depois do tratamento com a GAL e a conseguinte precipitação em etanol 80% e lavagem para purificação do polissacarídeo hidrolisado pela GAL, não sendo, portanto, realmente a mesma amostra utilizada no experimento de FT-IR. Um outro dado interessante foi a detecção de t- $\alpha$ -Glc p-(1 $\rightarrow$ ), não descartando a possibilidade da existência de algum tipo de glicano presente nas amostras, e podendo ser correspondente à quantidade de Glic obtida na análise de monossacarídeo. Entretanto, devido à falta de maiores informações analíticas, não se pode atribuir essa identificação de ligação com algum tipo especial de estrutura de polissacarídeo.



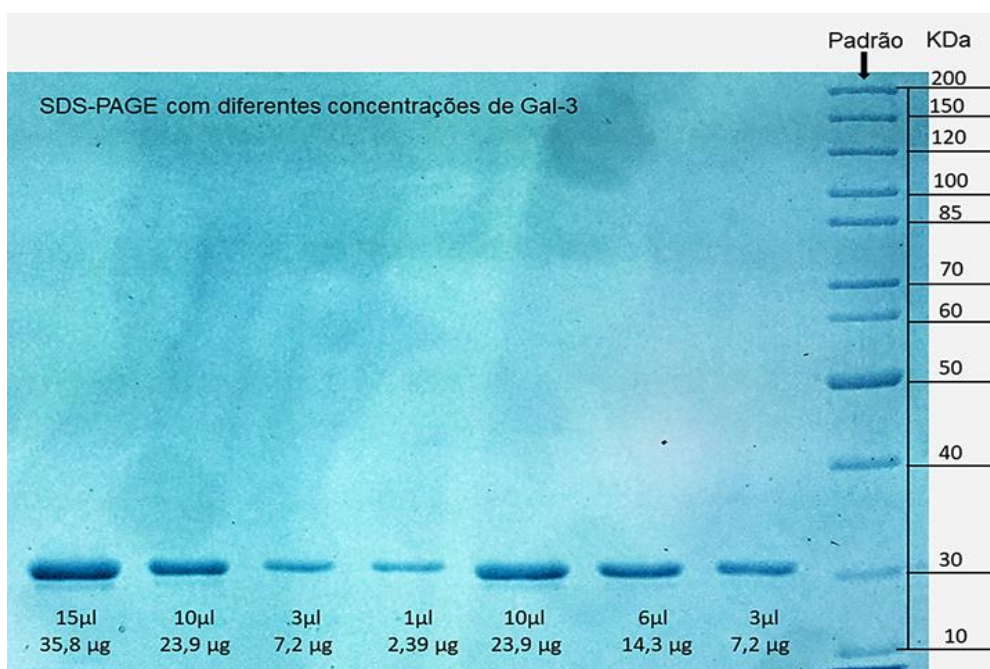
Código	Tipo de Açúcar	Proporção unitária de cada amostra			H <sup>1</sup> e C <sup>13</sup> NMR mudanças químicas (ppm)							
		Chuchu (%)	Mamão (%)	Maracujá (%)	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	OMe	COO
A	→4)-α-GalpA-(1→	76	71	99	5.15/ 101.1	3.76/ 69.9	4.02/ 69.9	4.5/ 80.1	4.78/ 73.4	--	--	-- /180
B	→4)-α-6-MeGalpA-(1→	11	14	<1	5.00/ 102.0	3.76/ 69.9	3.99/ 70.5	4.49/ 80.7	5.14/ 72.3	--	3.83/ 54.6	--
C	t-α-Glcp-(1→	14	14	<1	4.5/ 105.2	3.56/ 73.5	3.71/ 74.5	3.74/ 76.4	3.98/ 78.5	3.85/ 62.9	--	--

**Figura 15. Determinação estrutural das amostras FSA ME de chuchu, mamão e maracujá previamente digeridas com GAL por espectroscopia de RMN.** Os espectros de RMN das amostras digeridas mostram que restou um esqueleto de homogalacturonanos e não foi detectado resíduos de ramnose, provavelmente devido a níveis não detectáveis do monossacarídeo.

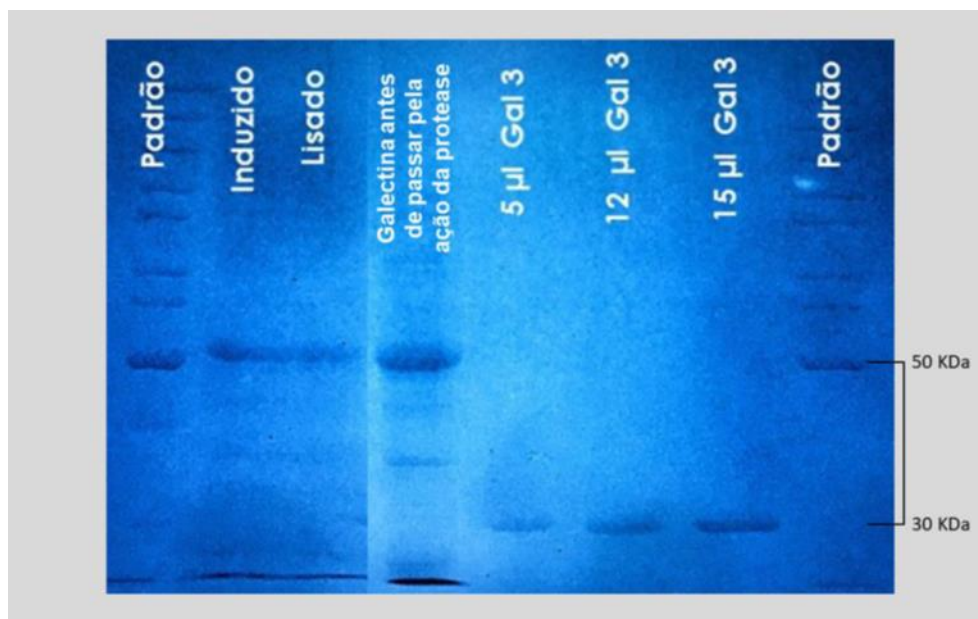
### 8.8 Análise do processo de obtenção e quantificação de Galectina-3 recombinante

A análise qualitativa do processo de obtenção da galectina-3 recombinante foi feita por SDS-PAGE. Amostras em diferentes concentrações da galectina-3 produzida foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%. A quantificação da proteína recombinante GAL-3 produzida, foi realizada com o BCA Kit da Thermo Fisher Scientific, como descrito no item 5.1.6, gerando um rendimento de 12,75 mg de GAL-3 por litro de meio (12,75 mg/L), e sendo produzidas um total 25,5 mg de GAL-3.





**Figura 16. SDS-PAGE de amostras de proteínas. Diferentes concentrações de galectina-3 foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%. O padrão usado foi Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). O peso molecular da gal-3 é de aproximadamente 30 kDa.**



**Figura 17. SDS-PAGE de amostras de sobrenadantes da expressão bacteriana e da purificação da GAL-3 utilizando as beads de GST. Diferentes amostras das etapas do processo de produção da gal-3 recombinante foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%. O padrão usado foi o *Unstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Antes da purificação da proteína recombinante GAL-3, o peso das amostras era de 50 KDa (GAL-3 + GST), após a purificação o peso molecular é de 30 KDa.**

### **8.9 Efeito das frações pécticas quanto ao potencial de inibição da Gal-3**

A galectina-3 (GAL-3) é uma proteína multifuncional – membro da família das lectinas – que se liga seletivamente a beta-galactosídeos e está envolvida em vários processos biológicos, apresentando importante papel na biologia tumoral, atuando em fenômenos como inibição de apoptose, aceleração do ciclo celular e instalação de metástase, além de ser um mediador da inflamação. Muitas funções da GAL-3 são dependentes de suas propriedades de ligação com carboidratos e essas ligações podem ser inibidas classicamente pela lactose (Dumic *et al.* 2006).

Os mecanismos anti-tumorais das pectinas modificadas estão correlacionados com sua atividade indutora de apoptose. A expressão excessiva de GAL-3 no citoplasma das células pode promover sua atividade anti-apoptótica, bem como aumenta a proliferação celular, crescimento tumoral, invasão e angiogênese, enquanto a expressão de GAL-3 no núcleo diminui a proliferação celular (Califice *et al.*, 2004). A pectina modificada atua no bloqueio da GAL-3, à princípio no meio extracelular, atuando como inibidor competitivo ao ligante natural dessa proteína.

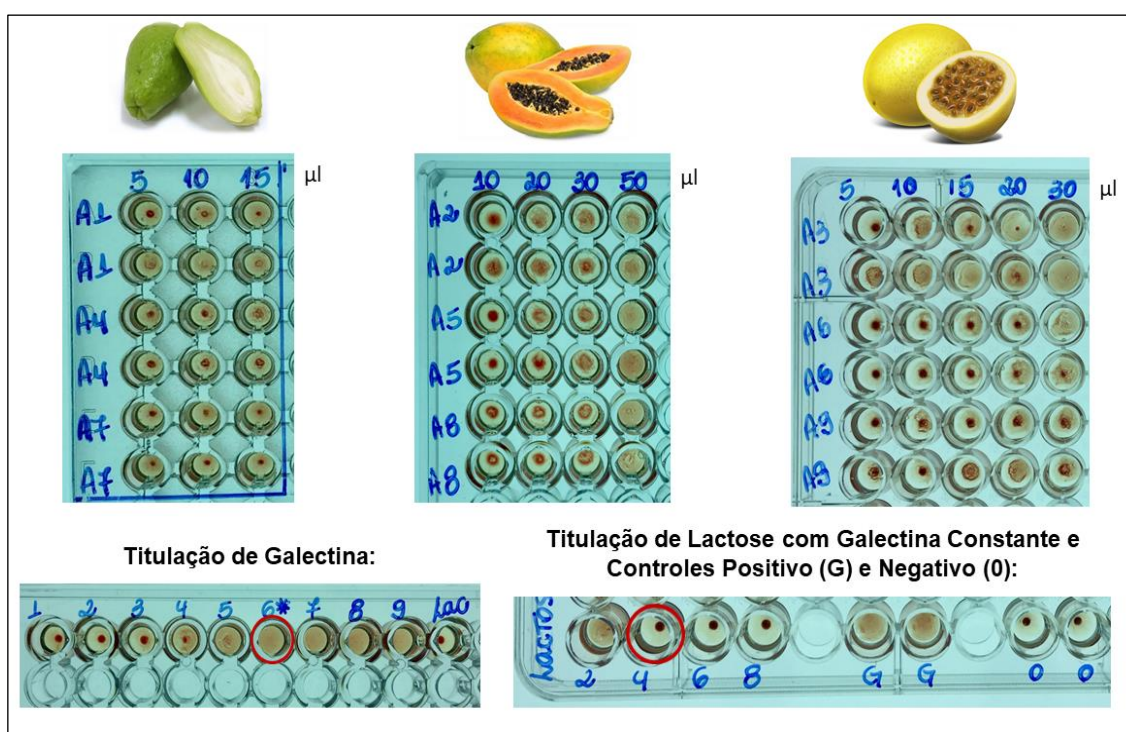
As frações pécticas dos polissacarídeos, isoladas de 3 diferentes fontes alimentares, foram avaliadas quanto à sua atividade inibitória de galectina-3 com base no ensaio de hemaglutinação. A concentração inibitória mínima (MIC) não pode ser determinada pois, aparentemente, maiores quantidades de pectinas interferem no ensaio. Entretanto, quando os resultados foram comparados com o ligante específico de GAL-3 (lactose), fica evidente que as pectinas modificadas exerceram um efeito inibitório da GAL-3. Não foi evidenciado na literatura até o momento a influência de que altas quantidades de pectina podem



influenciar no ensaio da hemaglutinação. Mas comparando com resultados prévios do grupo de pesquisa, onde pectinas de diversas fontes vegetais foram testadas negativamente para inibição da GAL-3 (inclusive em baixas concentrações), sugere-se que a modificação química, pelo menos para as pectinas de chuchus, mamões e maracujás, aumentou a capacidade de inibição da GAL-3.

Na figura 19 as frações modificadas de chuchu (A7 e A4) mamão (A8 e A5) e maracujá (A9 e A6) inibiram a hemaglutinação de uma forma mais visível e clara, semelhante ao que ocorre com a lactose (ligante específico da Gal-3). Essa inibição não ocorreu de forma dose-dependente, nos poços com volumes de amostra iguais ou superiores a 30 µl não se observa um ponto definido no fundo da placa devido à sedimentação celular (e não à hemaglutinação).

Alguns estudos sugerem que a galactose terminal é um fator chave para a propriedade inibitória da GAL-3. Essa evidência indica que a atividade inibitória pode estar correlacionada à presença do domínio RG-I (ramnogalacturonanos do tipo I) (Gao *et al.*, 2012; Gunning, Bongaerts, & Morris, 2009). Analisando os dados da composição de monossacarídeos, podemos observar que na amostra de pectinas FSA EM a quantidade de ramnose está aumentada nas amostras de mamão e maracujá, já na FSA ME tanto as quantidades de ácido galacturônico como de ramnose estão maiores nos 3 frutos. Esperava-se também o aumento de galactose, mas isso não foi verificado. Provavelmente a modificação química das pectinas diminuiu o peso molecular dos galactanos, tornado-os mais solúveis mas liberando também uma maior quantidade de ramnogalacturonanos, podendo ser esses os responsáveis pelo incremento na inibição da hemaglutinação destas amostras (FSA EM e FSA ME).



**Figura 18. Ensaio de inibição da hemaglutinação com sangue de coelho.** Legendas: A1 - FSA de chuchu; A4 - FSA ME de chuchu; A7 - FSA EM de chuchu; A2 - FSA de mamão; A5 - FSA ME de mamão; A8 - FSA EM de mamão; A3 - FSA de maracujá; A6 - FSA ME de maracujá; A9 - FSA EM de maracujá. Titulação de Galectina-3, o valor escolhido na curva foi o de 6 µl (concentração da galectina: 1 mg/mL). Controles: Curva de lactose nas massas de 2, 4, 6 e 8 µg; G - galectina + hemácias (controle positivo); 0 - apenas hemácias (controle negativo). As frações modificadas dos frutos (A4, A7, A5, A8, A6 e A9) inibiram a hemaglutinação de uma forma visivelmente mais clara e similar a lactose. O peso molecular diminuído pela modificação química, nestas frações, as torna mais solúveis. Concentração das amostras de pectina 1 µg/µl.

### 8.10 Efeito das frações pécticas na proliferação celular

As células (HCT-116 e HT-29) foram tratadas com frações pécticas de chuchu, mamão e maracujá, em diferentes concentrações (figura 19). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular, em comparação com o controle (sem tratamento). Os dados foram mostrados como média  $\pm$  DP com  $P < 0,05$  em relação ao controle de acordo com o teste de Dunnett.

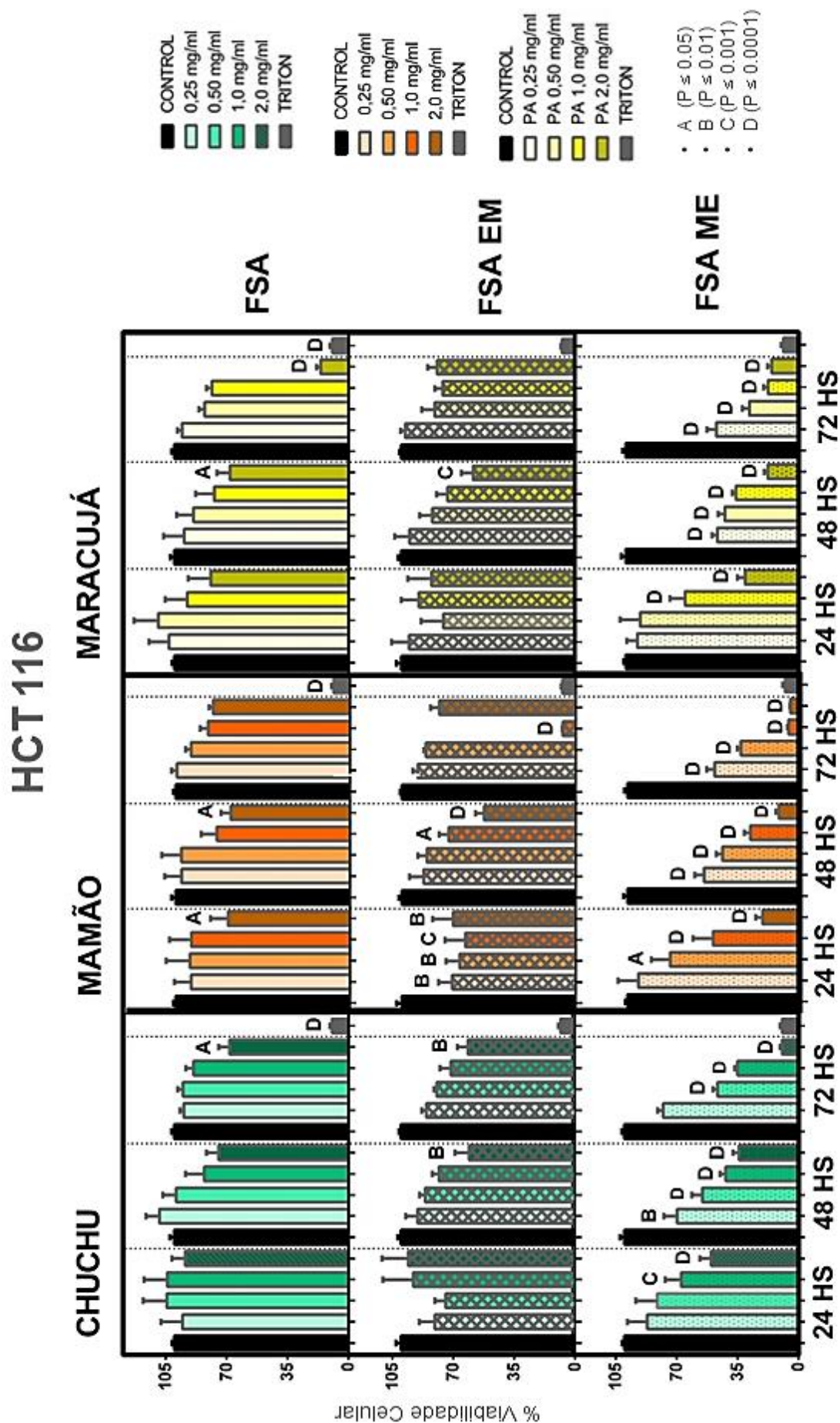
A estrutura da pectina descrita como responsável por atividades anti-câncer são as cadeias laterais de galactanos e arabinogalactanos juntamente com RG-I / HG, pelo menos para pectinas de mamões (PRADO *et al.*, 2017). As frações de

pectinas FSA ME dos frutos inibiram o crescimento celular (linhagens HCT-116, HT-29) em diferentes níveis com uma significância estatística superior. A queda da viabilidade celular das linhagens tratadas com as frações pécticas FSA ME, se mostrou dose dependente e se acentua com o tempo de tratamento onde após 72 horas a viabilidade é menor.

A atividade anti-câncer das pectinas parece estar ligada a um incremento da porcentagem de ácido galacturônico (GalA) como já observado anteriormente por Maxwell *et al.* (2015). As frações FSA ME, que tiveram um incremento de GalA, diminuíram significativamente a viabilidade celular nas duas linhagens celulares de câncer testadas. O alto peso molecular das amostras FSA (sem modificação química) pode ter dificultado a interação com as células de câncer testadas, diminuindo assim a atividade biológica das referidas amostras. As FSA EM, que tiveram seu peso molecular diminuído, mas não tiveram um incremento de GalA, apresentaram um resultado um pouco mais pronunciado do que as FSA dos frutos, demonstrando que não só a diminuição do peso molecular é relevante para uma melhor atividade biológica, mas também a composição de monossacarídeos é fundamental para tal efeito.

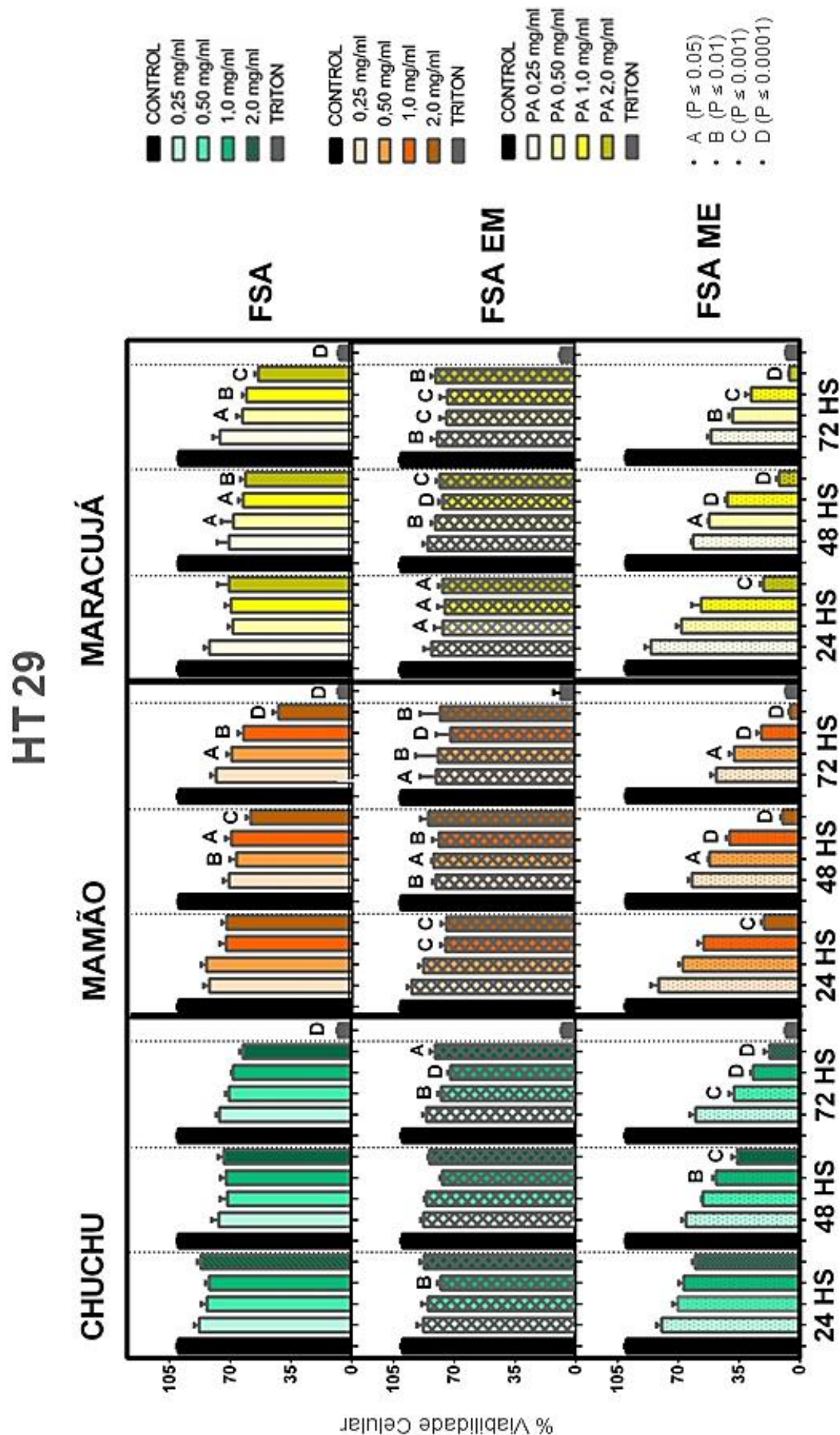
A modificação química da pectina dos frutos verdes mimetiza o amadurecimento natural de frutos, isso no caso das frações pécticas FSA ME, onde se modificou a FCT (fração celular total), processo similar ao que ocorre nos frutos climatéricos, como no caso do mamão.

A redução da proliferação celular está frequentemente associada a um efeito sobre a regulação do ciclo celular e / ou uma indução de apoptose, por esse motivo as células foram avaliadas por citometria de fluxo a fim de se verificar esses possíveis mecanismos.



**Figura 19. Gráficos de viabilidade celular (em porcentagem) da linhagem HCT 116 representados em barras.** As letras (A,B,C e D) representam, em ordem crescente de relevância, a diferença estatística obtida entre os dados comparados com o controle (apenas células), acordo com teste de Dunnett (A -  $p \leq 0,05$ ; B -  $p \leq 0,01$ ; C -  $p \leq 0,001$ ; D -  $p \leq 0,0001$ ;  $n = 9$ ).

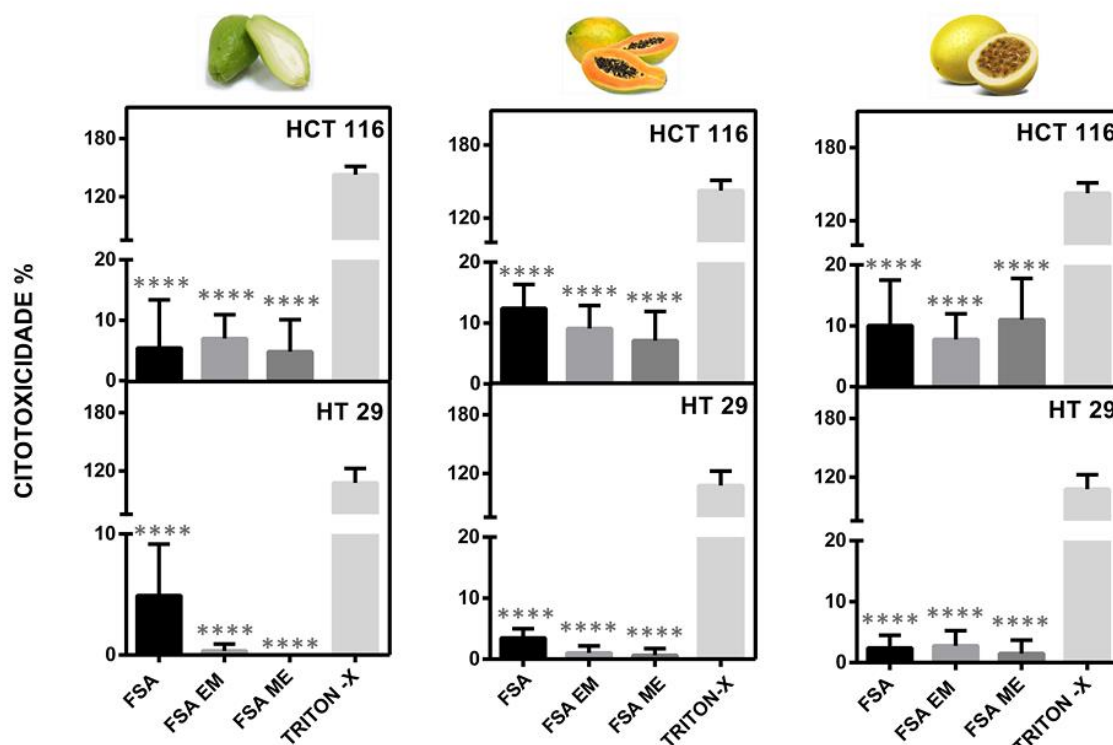




**Figura 20. Gráficos de viabilidade celular (em porcentagem) da linhagem HT 29 representados em barras.** As letras (A,B,C e D) representam, em ordem crescente de relevância, a diferença estatística obtida entre os dados comparados com o controle (apenas células), acordo com teste de Dunnett (A -  $p \leq 0,05$ ; B -  $p \leq 0,01$ ; C -  $p \leq 0,001$ ; D -  $p \leq 0,0001$ ;  $n = 9$ ).

### 8.11 Efeitos das frações pécnicas na citotoxicidade – LDH

A LDH é uma enzima citoplasmática estável presente em todas as células que é rapidamente liberada no sobrenadante da cultura celular quando a membrana plasmática é danificada.



**Figura 21. Análise da citotoxicidade dos polissacarídeos nas células de linhagem HCT 116 e HT 29 após 24 h de incubação.** As porcentagens de citotoxicidade foram determinadas pelo cálculo das médias de absorbância das amostras e controles em triplicata, subtraindo-se de cada um deles o valor da absorbância obtida no branco (apenas células). Os valores foram usados na seguinte equação: Citotoxicidade (%) = (controle alto – controle baixo)/(valor das amostras - controle baixo). A análise foi realizada no *software* Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA), a diferença estatística foi obtida entre os dados das frações FSA, FSA EM e FSA ME dos frutos comparados com o controle (Triton-X), de acordo com teste de Dunnett,  $P < 0,0001$ .

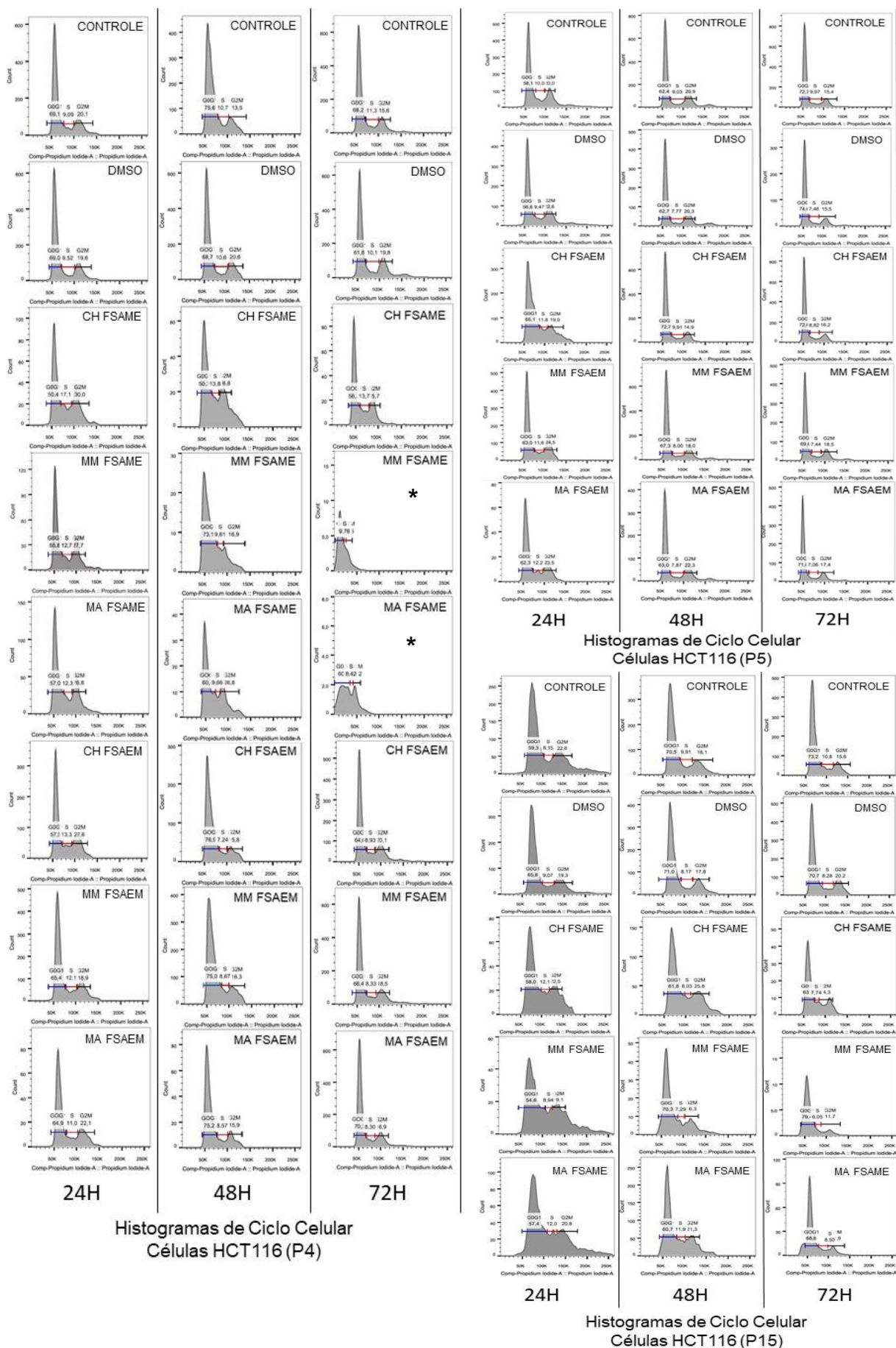
Os resultados obtidos no ensaio de LDH complementam os resultados do MTT. Comparando-se os dois testes, podemos notar que as amostras que mais afetaram a viabilidade celular, pectinas de mamão e maracujá, apresentaram um valor de citotoxicidade discretamente aumentado com relação as do chuchu. Entretanto o LDH liberado em todos os tratamentos foi muito pequeno se comparado ao controle de lise Triton-X, mostrando que as amostras não são citotóxicas em nível prejudicial.

### **8.12 Efeitos das frações pécticas no ciclo celular**

O ciclo celular é um processo altamente organizado que garante a duplicação do material genético e a divisão celular. Defeitos na sua regulação são uma causa comum de proliferação anormal de células cancerosas. Os mecanismos de organização deste processo envolvem sinais reguladores do crescimento bem como sinais de proteínas que monitoram a integridade genética. A proliferação depende da progressão através de quatro fases distintas do ciclo celular - G0 / G1, S, G2 e M (Otto & Sicinski, 2017).

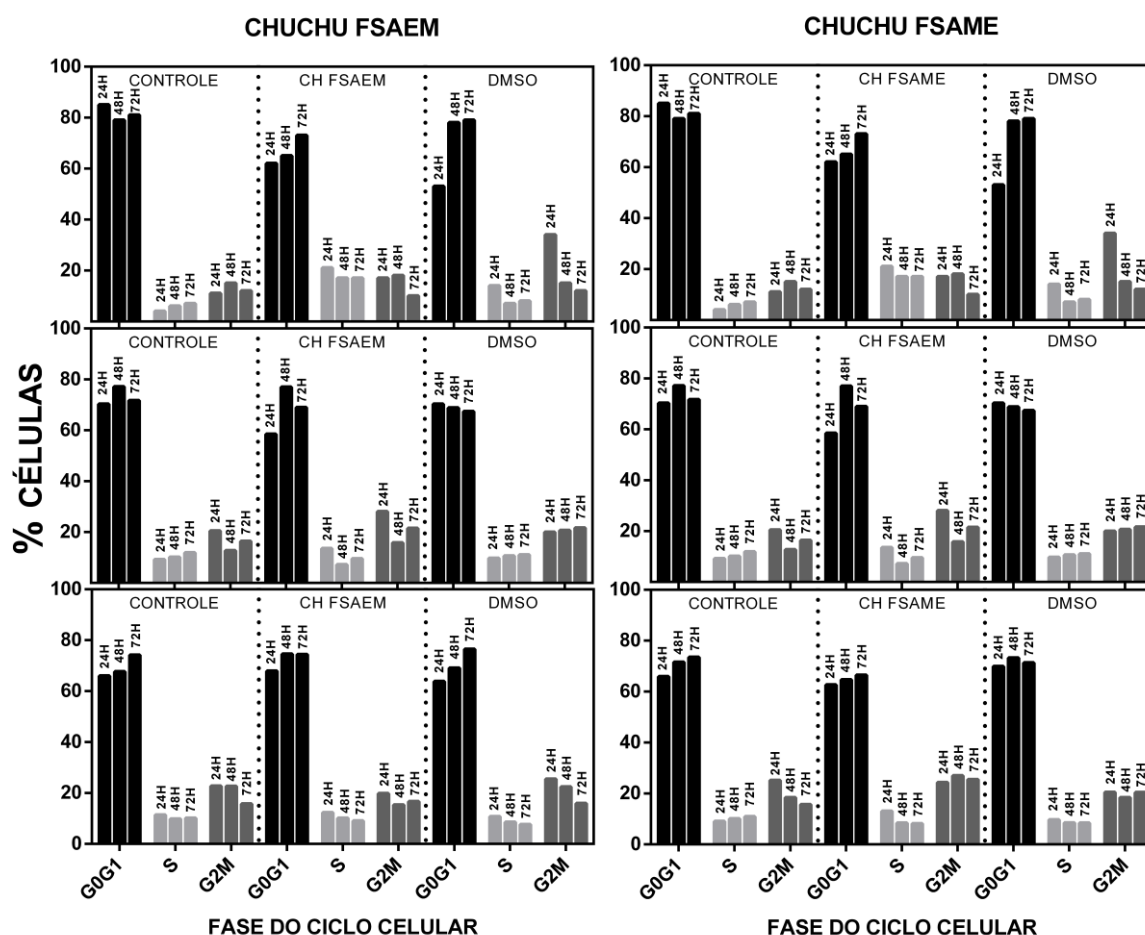
Para se determinar se as pectinas modificadas dos frutos afetaram ou não o crescimento das células tumorais, escolhemos dar prosseguimento com as células HCT116. O tratamento dessas células com as pectinas aqui estudadas, mas também com outras pectinas estudadas pelo nosso grupo (PRADO et al., 2017; 2019), mostram que essa linhagem celular é mais afetada pelo tratamento com as pectinas. Sendo assim, foi realizado o ensaio de progressão do ciclo celular nos tempos de 24h, 48h e 72h para as células HCT116. As frações testadas foram as que promoveram a maior inibição da viabilidade celular (FSA EM e FSA ME) na concentração de 1mg/mL (0,1%).

As células foram coradas com iodeto de propídio (PI) e a distribuição celular foi avaliada por citometria de fluxo, baseada no tamanho do DNA corado. Os efeitos da administração dos polissacarídeos na progressão do ciclo celular são mostrados nos histogramas (figura 22) e gráficos a seguir (figuras 23,24,25 e 26).



**Figura 22. Histogramas com a progressão da distribuição das células HCT116 nas fases do ciclo celular.** \* Após 72 horas, as células tratadas com as amostras FSA ME de mamão e maracujá apresentaram intensa morte celular, isto pode ter interferido na proporção das células nas fases do ciclo 72H. Os ensaios foram realizados de forma independente com triplicatas biológicas e quantificados com o software FlowJo (versão 10.0.7, Ashland,OR, EUA).

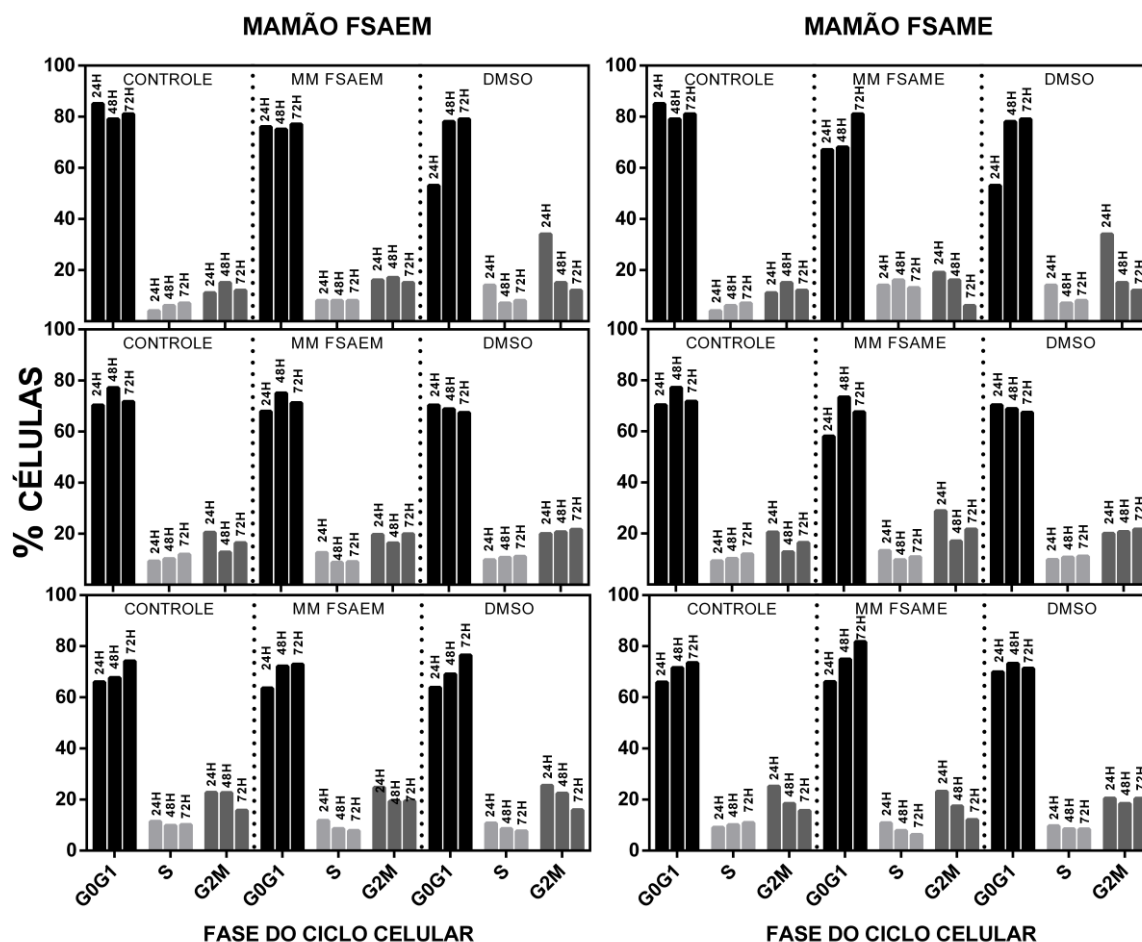




CÉLULAS HCT116 - TRIPLICATA BIOLÓGICA

Porcentagem de Células										
Amostra	Célula	G0G1			S			G2M		
		24H	48H	72H	24H	48H	72H	24H	48H	72H
Controle 1	HCT116 P2	84,89	79,10	81,12	3,93	5,68	7,02	11,17	15,21	11,85
Controle 2	HCT116 P4	70,30	77,13	71,71	9,24	10,13	11,88	20,44	12,73	16,40
Controle 3	HCT116 P5	65,94	67,58	74,13	11,35	9,78	10,16	22,70	22,63	15,70
Controle 4	HCT116 P15	65,85	71,56	73,49	9,05	10,05	10,84	25,09	18,37	15,66
CH FSAEM 1	HCT116 P2	76,55	75,52	77,57	5,80	6,58	6,09	17,63	17,89	16,32
CH FSAEM 2	HCT116 P4	58,43	76,94	68,99	13,51	7,24	9,53	28,04	15,80	21,46
CH FSAEM 3	HCT116 P5	67,88	74,55	74,37	12,30	10,16	9,03	19,81	15,28	16,59
CH FSAME 1	HCT116 P2	61,56	65,12	72,82	21,15	16,86	16,72	17,27	18,00	10,45
CH FSAME 2	HCT116 P4	51,69	55,88	58,78	17,53	15,18	14,33	30,76	29,48	26,88
CH FSAME 3	HCT116 P15	62,63	64,62	66,42	13,06	8,39	8,10	24,29	26,97	25,46
DMSO 1	HCT116 P2	52,59	78,09	79,23	13,73	6,66	8,43	33,67	15,24	12,33
DMSO 2	HCT116 P4	70,32	68,76	67,39	9,70	10,61	11,01	19,97	20,62	21,59
DMSO 3	HCT116 P5	67,88	74,55	74,37	12,30	10,16	9,03	19,81	15,28	16,59
DMSO 4	HCT116 P15	69,87	73,21	71,28	9,63	8,42	8,34	20,49	18,35	20,36

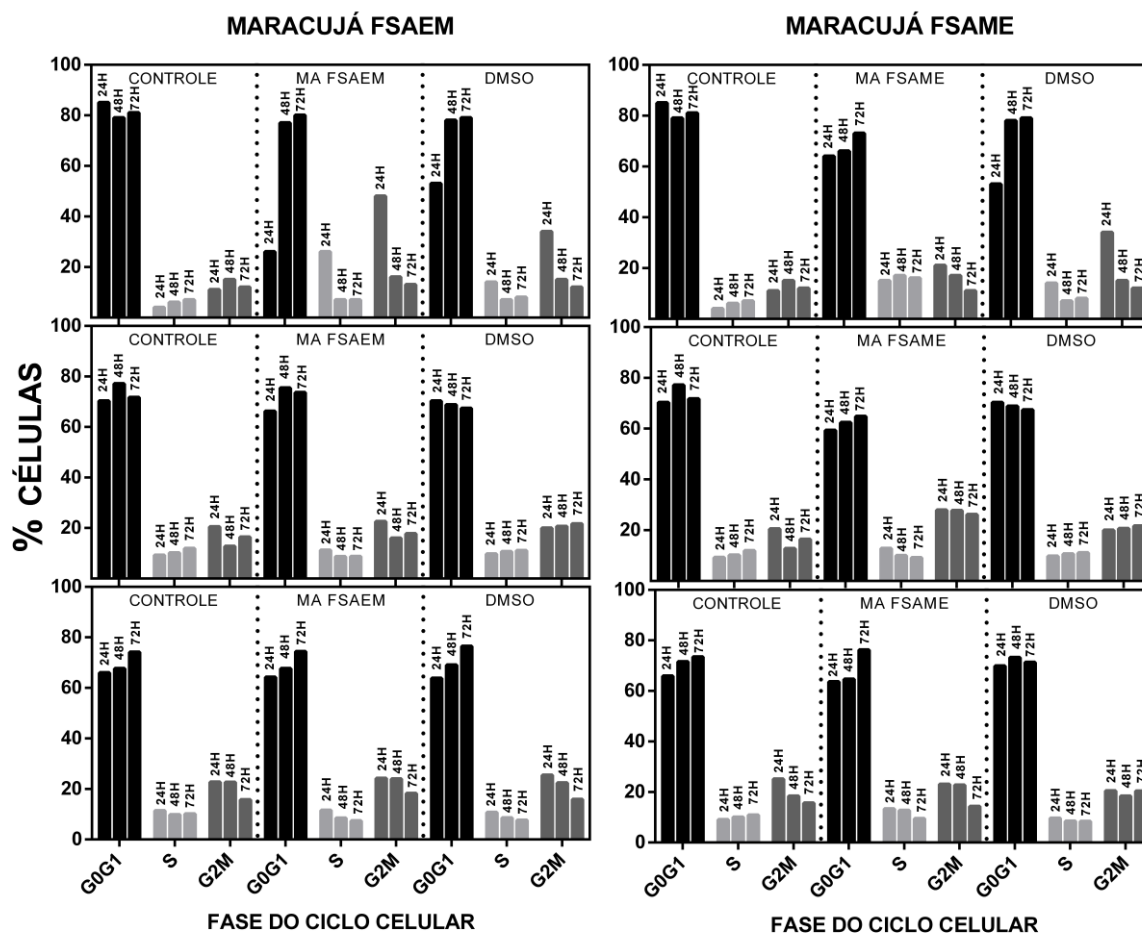
**Figura 23. Distribuição do ciclo celular em células HCT116, tratadas com pectinas de chuchu, frações FSAEM e FSAME, nos tempos 24, 48 e 72 horas.** As frações escolhidas foram as que apresentaram os melhores resultados na inibição da viabilidade celular. Os controles utilizados neste ensaio foram células sem tratamento e células tratadas com DMSO. Observa-se, nas amostras tratadas com as pectinas de chuchu, uma diminuição do percentual de células que passam da fase G0 G1 para a fase S com o decorrer do tempo. Nas amostras tratadas com as frações FSAME a morte celular após 72 horas foi acentuada, essa diminuição na viabilidade celular pode interferir na proporção dos resultados.



CÉLULAS HCT116 - TRIPLICATA BIOLÓGICA

Amostra	Célula	Porcentagem de Células								
		G0G1 24H	G0G1 48H	G0G1 72H	S 24H	S 48H	S 72H	G2M 24H	G2M 48H	G2M 72H
Controle 1	HCT116 P2	84,89	79,10	81,12	3,93	5,68	7,02	11,17	15,21	11,85
Controle 2	HCT116 P4	70,30	77,13	71,71	9,24	10,13	11,88	20,44	12,73	16,40
Controle 3	HCT116 P5	65,94	67,58	74,13	11,35	9,78	10,16	22,70	22,63	15,70
Controle 4	HCT116 P15	65,85	71,56	73,49	9,05	10,05	10,84	25,09	18,37	15,66
MM FSAEM 1	HCT116 P2	76,21	74,97	76,73	7,86	7,82	8,23	15,91	17,19	15,02
MM FSAEM 2	HCT116 P4	67,84	75,02	71,22	12,55	8,67	8,93	19,60	16,30	19,84
MM FSAEM 3	HCT116 P5	63,57	72,13	72,84	11,70	8,57	7,78	24,72	19,29	19,36
MM FSAME 1	HCT116 P2	66,72	67,69	80,85	14,46	16,34	12,89	18,81	15,95	6,25
MM FSAME 2	HCT116 P4	58,00	73,38	67,58	13,20	9,64	10,81	28,79	16,96	21,60
MM FSAME 3	HCT116 P15	66,06	74,87	81,79	10,81	7,76	6,22	23,11	17,36	12,04
DMSO 1	HCT116 P2	52,59	78,09	79,23	13,73	6,66	8,43	33,67	15,24	12,33
DMSO 2	HCT116 P4	70,32	68,76	67,39	9,70	10,61	11,01	19,97	20,62	21,59
DMSO 3	HCT116 P5	67,88	74,55	74,37	12,30	10,16	9,03	19,81	15,28	16,59
DMSO 4	HCT116 P15	69,87	73,21	71,28	9,63	8,42	8,34	20,49	18,35	20,36

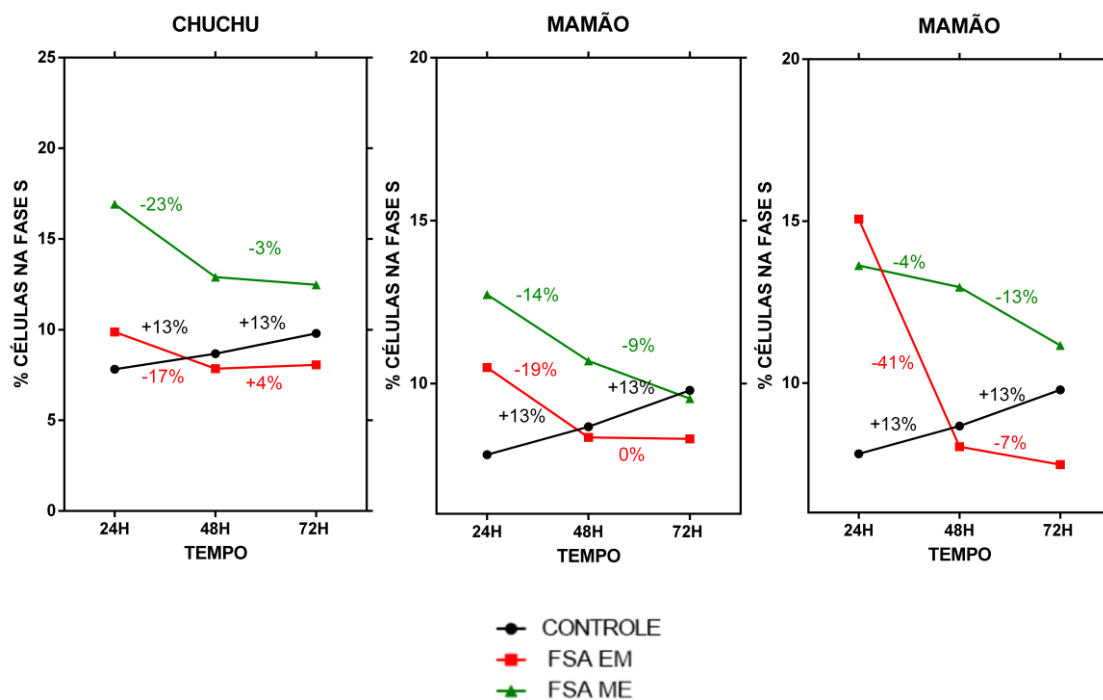
**Figura 24. Distribuição do ciclo celular em células HCT116, tratadas com pectinas de mamão frações FSAEM e FSAME, nos tempos 24, 48 e 72 horas.** As frações escolhidas foram as que apresentaram os melhores resultados na inibição da viabilidade celular. Os controles utilizados neste ensaio foram células sem tratamento e células tratadas com DMSO. Observa-se, nas amostras tratadas com as pectinas de mamão, uma diminuição do percentual de células que passam da fase G0G1 para a fase S com o decorrer do tempo. Nas amostras tratadas com as frações FSAME a morte celular após 72 horas foi acentuada, essa diminuição na viabilidade celular pode interferir na proporção dos resultados.



CÉLULAS HCT116 - TRIPPLICATA BIOLÓGICA

Amostra	Célula	Porcentagem de Células								
		G0G1 24H	G0G1 48H	G0G1 72H	S 24H	S 48H	S 72H	G2M 24H	G2M 48H	G2M 72H
Controle 1	HCT116 P2	84,89	79,10	81,12	3,93	5,68	7,02	11,17	15,21	11,85
Controle 2	HCT116 P4	70,30	77,13	71,71	9,24	10,13	11,88	20,44	12,73	16,40
Controle 3	HCT116 P5	65,94	67,58	74,13	11,35	9,78	10,16	22,70	22,63	15,70
Controle 4	HCT116 P15	65,85	71,56	73,49	9,05	10,05	10,84	25,09	18,37	15,66
MA FSAEM 1	HCT116 P2	25,61	77,05	80,22	26,40	7,15	6,51	47,97	15,79	13,25
MA FSAEM 2	HCT116 P4	66,22	75,44	73,58	11,22	8,59	8,70	22,55	15,95	17,71
MA FSAEM 3	HCT116 P5	64,22	67,61	74,37	11,54	8,44	7,39	24,22	23,93	18,22
MA FSAME 1	HCT116 P2	64,03	65,82	72,90	14,88	17,25	16,20	21,07	16,91	10,89
MA FSAME 2	HCT116 P4	59,31	62,35	64,78	12,79	9,97	9,09	27,88	27,66	26,12
MA FSAME 3	HCT116 P15	63,63	64,64	76,22	13,30	12,67	9,44	23,05	22,68	14,33
DMSO 1	HCT116 P2	52,59	78,09	79,23	13,73	6,66	8,43	33,67	15,24	12,33
DMSO 2	HCT116 P4	70,32	68,76	67,39	9,70	10,61	11,01	19,97	20,62	21,59
DMSO 3	HCT116 P5	67,88	74,55	74,37	12,30	10,16	9,03	19,81	15,28	16,59
DMSO 4	HCT116 P15	69,87	73,21	71,28	9,63	8,42	8,34	20,49	18,35	20,36

**Figura 25.** Distribuição do ciclo celular em células HCT116, tratadas com pectinas de maracujá frações FSAEM e FSAME, nos tempos 24, 48 e 72 horas. As frações escolhidas foram as que apresentaram os melhores resultados na inibição da viabilidade celular. Os controles utilizados neste ensaio foram células sem tratamento e células tratadas com DMSO. Observa-se, nas amostras tratadas com as pectinas de maracujá, uma diminuição do percentual de células que passam da fase G0G1 para a fase S com o decorrer do tempo. Nas amostras tratadas com as frações FSAME a morte celular após 72 horas foi acentuada, essa diminuição na viabilidade celular pode interferir na proporção dos resultados.



**Figura 26.** As pectinas modificadas dos frutos induziram a parada do ciclo celular da fase G0-G1 para a fase S em células da linhagem HCT116. A análise foi realizada no *software* Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA). Foram apresentados resultados da média geométrica das porcentagens de células na fase S de três experimentos independentes.

Os resultados sugerem a parada do ciclo celular na fase G0-G1, pois o número de células (em %) foi primeiramente diminuindo na fase S com a evolução do tempo, para também ser reduzido na fase G2M. Esses dados são indicativos de que houve uma redução de células que passaram da fase G0-G1 para as próximas fases. Sendo assim, podemos inferir que os tratamentos com os polissacarídeos estão exercendo um efeito citostático nas células da linhagem HCT116. A inibição da proliferação celular observada para os tratamentos analisados pode ser o resultado de efeitos no ciclo celular ou indução de apoptose ou ainda uma combinação dos dois.

O tratamento na linhagem celular HCT 116 com os polissacarídeos de chuchu, mamão e maracujá resultou em um acúmulo de células na fase G0-G1 e um declínio significativo de células na progressão para as fases S e G2-M com o

passar do tempo em comparação com o controle de células, inclusive em relação com as amostras tratadas com o composto citotóxico DMSO.

Em outros trabalhos utilizando pectinas, diversos autores verificaram a parada na fase G2/M do ciclo. Em estudo realizado por Cheng et al. (2013) com pectinas de batata ricas em RG-I, os dados mostraram que essas pectinas inibiram a proliferação de células HT-29 e induziram a parada significativa do ciclo celular em G2 / M. Este efeito inibitório foi devido à regulação negativa da expressão do complexo ciclina B1/CDK1. Em outro trabalho, células UBC de câncer de bexiga urinária tratadas com pectina cítrica modificada exibiram parada de fase G2 / M com a diminuição da ciclina B1 e Cdc2 fosforilada (Fang et al., 2018). A pectina de ginseng rica em HG inibiu a proliferação celular e o ciclo celular induzindo parada na fase G2 / M (Cheng et al., 2011). Salehi et al., (2018) tratou as células cancerígenas de mama com pectina de citros e observou uma parada nas fases S e G1, como no nosso caso, e também trataram as mesmas células com pectina de maçã, parando o ciclo celular em G2 / M. Delphi et al. (2015) relataram que os oligossacarídeos pécticos da maçã causaram parada do ciclo celular sub-G1 e induziram a apoptose dependente de caspase em células MDA-MB-23145 de câncer de mama. Além disso, Sun et al. (2008) mostraram que, extrato da maçã prende as células MCF-7 de câncer de mama na fase G1 do ciclo celular, reduzindo a expressão das proteínas ciclina D1 e Cdk446.

Um estudo de 2005 com a fucoxantina, uma carotenoide natural, detectou que esse composto inibiu a proliferação de células cancerígenas do cólon. O mecanismo inibitório foi devido à parada do ciclo celular durante a fase G0 / G1 mediada pela regulação positiva de p21WAF1 / Cip1, que pode estar relacionada à atividade antitumorigênica.

No nosso estudo, as pectinas modificadas dos frutos induziram a parada das células na fase G1 do ciclo, portanto um dos vários mecanismos de atividade antiproliferativa destas pectinas pode estar relacionado a efeitos na modulação do ciclo celular.

### **8.13 Efeitos das frações pectica na indução da apoptose**

A redução na viabilidade celular está frequentemente associada a efeitos na regulação do ciclo celular e na indução da apoptose. Para explorarmos os mecanismos pelos quais as frações modificadas induziram a morte das células cancerígenas, foi realizada a análise de apoptose celular por citometria de fluxo e posterior comparação com os resultados obtidos na expressão de biomarcadores genéticos. Após o tratamento das células por 24 horas a apoptose tardia foi induzida de forma significativa, tanto na amostra MM FSA ME (mamão) como na MA FSA ME (maracujá) em ambas linhagens testadas. Nas amostras tratadas com a pectina de chuchu (CH FSA ME) o resultado não foi muito expressivo.

A apoptose tardia induzida pelas pectinas modificados pode estar relacionada a ligação dessas frações com a Gal-3, e também com o estímulo da expressão de genes pró-inflamatórios que serão vistos no ensaio de qPCR.



### **8.14 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de biomarcadores genéticos (PCR em tempo real)**

O câncer pode ser visto como um distúrbio no equilíbrio homeostático entre o crescimento celular e a morte celular. A superexpressão de genes antiapoptóticos e a diminuição da expressão de genes pró-apoptóticos podem resultar na falta de morte celular característica do câncer. A PCR Quantitativa em Tempo Real oferece uma ferramenta poderosa para a quantificação da expressão desses genes, tendo em vista o fato de que as terapias direcionadas ao câncer visam interromper as funções de proteínas que desempenham um papel importante durante a progressão do câncer (Radha & Raghavan, 2017).

Todas as frações dos polissacarídeos de chuchu, mamão e maracujá foram analisadas com relação aos efeitos na expressão de genes relacionados com a apoptose (HADC1, TNF, RIPK1, BCL2 e MLKL), crescimento e proliferação celular (TGF $\beta$ 1, interleucina-1, EGF, CCNB1IP1 e MTOR), fatores de transcrição/reguladores (HADC5 e NF $\kappa$ B1), degradação da matriz celular (MMP-9) e adesão celular (CDH1), em células de carcinoma colorretal da linhagem HCT116 e HT29.

#### ***8.14.1 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a apoptose***

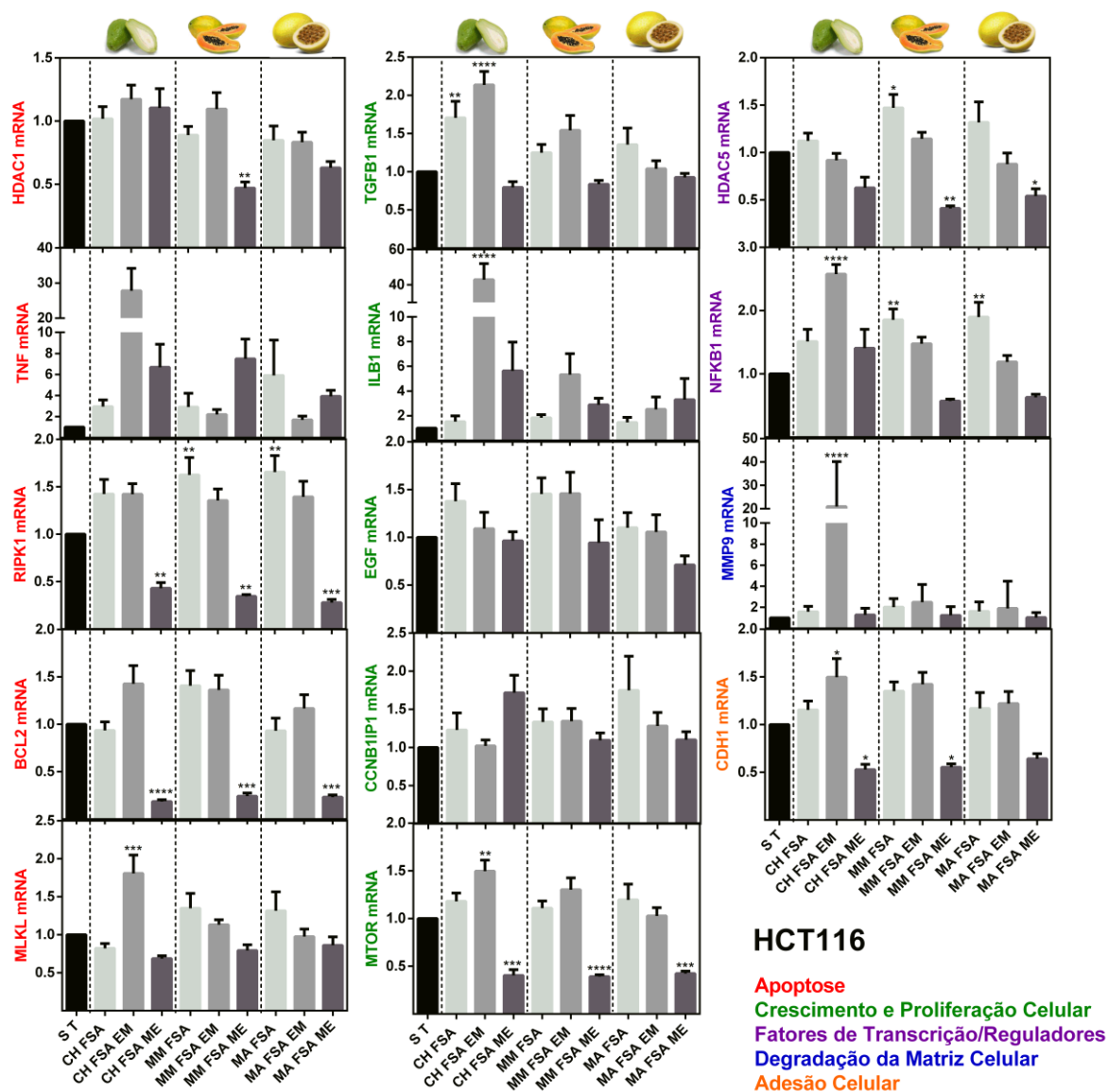
Um número crescente de genes tem sido identificado como capazes de influenciar o processo de apoptose (figura 27). As histonas desacetilases (HDACs) são enzimas que removem os produtos de acetilação das histonas, compactam a estrutura da cromatina e reprimem a transcrição. Os HDACs atuam em vários substratos proteicos não histônicos que desempenham um papel na regulação da expressão gênica, proliferação celular, migração



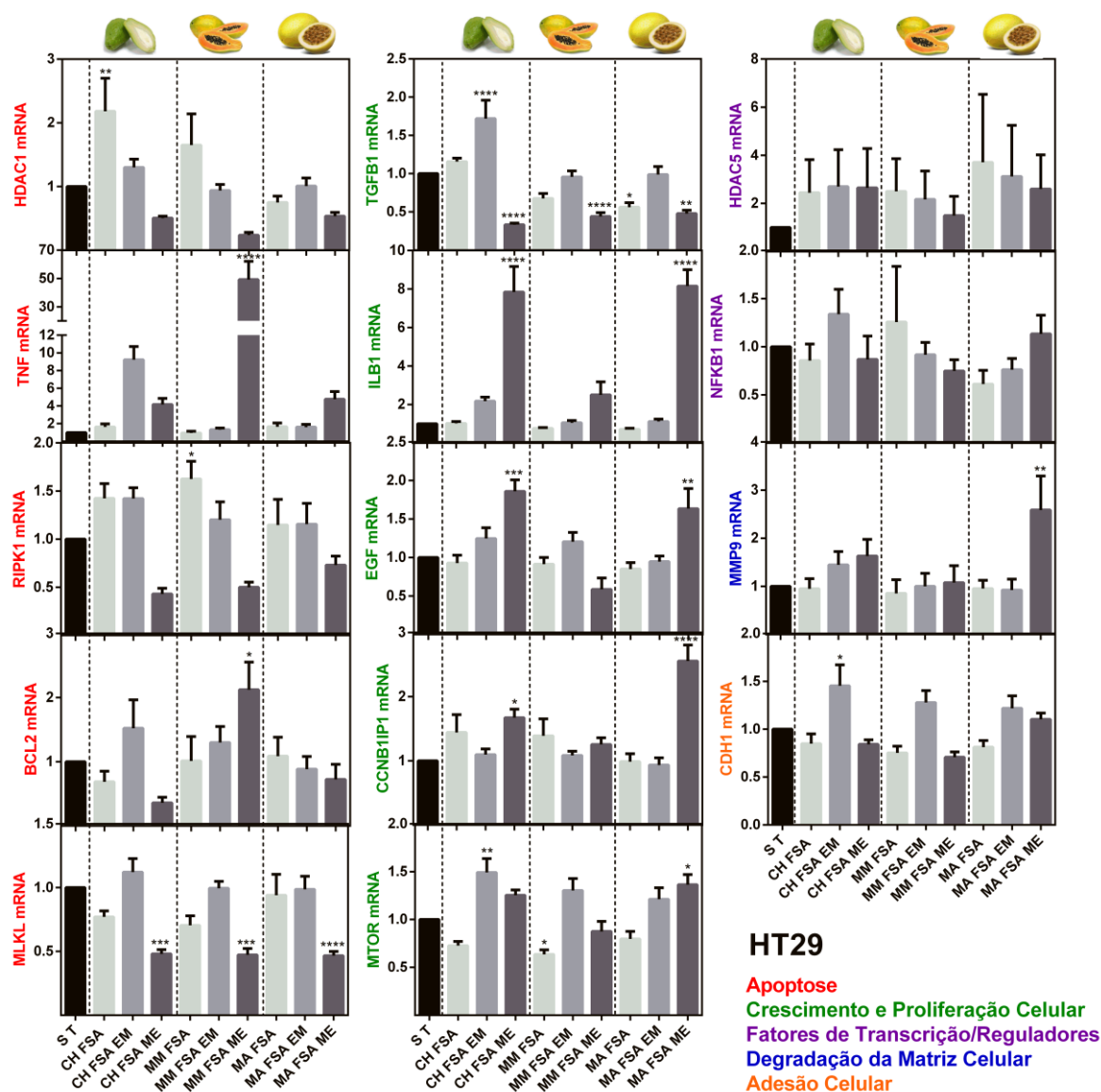
celular, morte celular e angiogênese. Dados de estudos pré-clínicos demonstraram que os inibidores de histona desacetilase têm potente atividade anticâncer (Cheng *et al.*, 2013). O maior efeito biológico dos inibidores de HDAC vem da indução de diferenciação em células tumorais, retenção do ciclo celular em G0/G1, ativação da apoptose celular e aumento da sensibilidade celular para quimioterapia e radioterapia.

Os níveis de expressão da proteína HDAC1 foram regulados negativamente após a exposição das células HCT116 à pectina modificada de mamão (MM FSA ME) por 24h. Houve também uma diminuição, não significativa, da expressão de HDAC1 nas células HT29 tratadas com as frações FSA ME.

Acredita-se que o gene HDAC5 esteja associado ao câncer de cólon. No entanto, a função biológica da HDAC5 no câncer colorretal humano ainda não foi completamente elucidada (Ping *et al.*, 2015). O HDAC5 teve sua expressão diminuída no tratamento com pectina de mamão modificada (MM FSA ME) e pectina de maracujá (MA FSA ME) nas células HCT 116. Já na linhagem HT29 não foram encontradas alterações significativas.



**Figura 28.** Efeitos dos polissacarídeos de chuchu, mamão e maracujá na expressão de genes relacionados com a apoptose (HADC1, TNF, RIPK1, BCL2 e MLKL), crescimento e proliferação celular (TGF $\beta$ 1, interleucina-1, EGF, CCNB1IP1 e MTOR), fatores de transcrição/reguladores (HADC5 e NFKB1), degradação da matriz celular (MMP-9) e adesão celular (CDH1), em células de carcinoma colorretal da linhagem HCT 116. A média geométrica dos valores de CT (limiar do ciclo) dos genes normatizadores (ACTB, GADH e UCHL5), foram usadas para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo analisados, segundo o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak et al. (2001). Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados representados como média  $\pm$  SEM. Foi realizada análise de variância one-way ANOVA com o teste de Dunnett, que avalia diferenças entre o grupo controle e os demais grupos (significância  $P < 0.05$ ).



**Figura 29.** Efeitos dos polissacarídeos de chuchu, mamão e maracujá na expressão de genes relacionados com a apoptose (HADC1, TNF, RIPK1, BCL2 e MLKL), crescimento e proliferação celular (TGFβ1, interleucina-1, EGF, CCNB1IP1 e MTOR), fatores de transcrição/reguladores (HADC5 e NFKB1), degradação da matriz celular (MMP-9) e adesão celular (CDH1), em células de carcinoma colorretal da linhagem HT 29. A média geométrica dos valores de CT (limiar do ciclo) dos genes normatizadores (ACTB, GADH e UCHL5), foram usadas para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo analisados segundo o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak et al. (2001). Todas as amostras foram testadas em nonoplicata e os resultados representados como média  $\pm$  SEM. Foi realizada análise de variância one-way ANOVA com o teste de Dunnett, que avalia diferenças entre o grupo controle e os demais grupos (significância  $P < 0.05$ ).

O TNF (Fator de Necrose Tumoral) é uma citocina pró inflamatória capaz de provocar a morte de células por apoptose. É secretada principalmente por macrófagos e está envolvida na regulação de amplo espectro de processos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação. A desregulação desta citocina pode causar várias doenças, incluindo doenças autoimunes, resistência à insulina e câncer. Suas vias estão relacionadas à modulação da apoptose e à sinalização da interleucina-10. Após ser produzido e liberado, o TNF se liga a receptores específicos para estimular a transcrição e a produção da enzima I $\kappa$ B quinase, responsável pela produção do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B, quando ativado, irá agir no núcleo da célula, induzindo a produção de diversas proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica.

O TNF pode apresentar efeitos pró e antitumorais dependendo do contexto: por um lado o TNF poderia ser um promotor de tumor endógeno, pois estimula o crescimento, proliferação, invasão, metástase de células cancerígenas e angiogênese do tumor. Por outro lado, o TNF também possui propriedade de induzir a morte de células cancerígenas, o que o torna uma boa alternativa terapêutica para o câncer (Wang & Lin, 2008). Houve um aumento bastante significativo do TNF em todos os tratamentos e linhagens celulares, e por isso que a apoptose pode ter sido estimulada, representando algo ainda inédito na literatura em relação ao tratamento de células de câncer com pectinas. Esse gene pode ser um alvo importante para o tratamento de células cancerígenas com as pectinas.

A RIPK1 quinase emergiu como um alvo terapêutico promissor para o tratamento de uma ampla gama de doenças, incluindo o câncer. Vários estudos

demonstraram que o RIPK1 é um mediador chave da morte celular apoptótica e necrótica, bem como de vias inflamatórias e a inibição desse gene seria um alvo importante para o tratamento do câncer (Degterev *et al.*, 2019). As células tratadas com as frações FSA ME inibiram a expressão de RIPK1. No tratamento com as frações FSA, entretanto, foi observado um estímulo na expressão desta mesma proteína.

O BCL-2 é um proto-oncogene que atua como importante regulador da apoptose e da morte celular programada. Este gene codifica uma proteína de membrana mitocondrial externa que bloqueia a morte apoptótica de algumas células. Certas células normais produzem níveis relativamente altos de BCL-2. Acredita-se que isso preserve células cuja morte seria danosa para o organismo. O excesso de proteção, todavia, traz uma consequência: quando se tornam cancerosas, células costumemente geraram tumores mais agressivos, já que resistem mais à morte programada. Atualmente, a via da família de proteínas linfoma-2 de células B anti-apoptóticas (BCL-2) está sendo direcionada para a terapia antineoplásica. A superexpressão de membros dessa família tem sido associada à resistência à quimioterapia em vários cânceres (Kang & Reynolds, 2009). Nas células HCT116 tratadas com as pectinas podemos notar uma diminuição bem acentuada na expressão do BCL-2 nas frações FSA ME dos frutos e um aumento de expressão nas frações FSA e FSA EM.

O gene MLKL pertence à superfamília das proteínas quinases. Esta proteína desempenha um papel crítico na indução da necroptose pelo fator de necrose tumoral (TNF), em um processo programado de morte celular, via interação com a proteína quinase RIP3. A liberação de MLKL fosforilada nas vesículas extracelulares serve como um mecanismo para auto restrição da atividade

necroptótica dessa proteína (Yoon *et al.*, 2017). Altos níveis dessa proteína e RIP3 estão associados à doença inflamatória intestinal em crianças. A expressão do MLKL foi inibida de forma significativa nas células HT29 tratadas com as frações FSA ME dos frutos.

#### **8.14.2 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados ao crescimento e proliferação celular**

O TGF $\beta$ 1 (Fator Transformador de Crescimento beta1) atua na proliferação, diferenciação e crescimento celular de vários tipos celulares em processos fisiológicos e patológicos. Dados na literatura mostram resultados contraditórios sobre o envolvimento do TGF $\beta$ 1 na carcinogênese, mas este gene é frequentemente superexpresso em células tumorais. Alguns estudos também demonstraram que as células cancerígenas que superexpressam o TGF- $\beta$ 1 são resistentes aos seus efeitos inibitórios no crescimento celular, sendo capazes de se tornar mais invasivas e metastáticas (Gulubova *et al.*, 2018).

As citocinas anti-inflamatórias como a interleucina (IL) -10 e fator de crescimento transformador TGF- $\beta$ 1 podem ter um papel complexo na carcinogênese colorretal. O TGF- $\beta$ 1 é uma molécula de sinalização multifuncional com uma ampla variedade de papéis. Atua como um fator antiproliferativo em células epiteliais normais e em estágios iniciais da oncogênese. Regula fortemente a função imune e pode inibir a proliferação e ativação das células imunes (Gulubova *et al.*, 2018). Nas células HCT116 o TGF $\beta$ 1 teve a sua expressão aumentada, enquanto na linhagem HT29 a sua expressão foi diminuída com exceção da amostra de chuchu extraída e modificada (CH FSA EM).

Existe uma associação entre inflamação crônica e desenvolvimento ou progressão tumoral. A IL-1, uma citocina pró-inflamatória tem sido implicada

como um fator na progressão do tumor através da expressão de genes metastáticos, angiogênicos e fatores de crescimento. Diversos estudos relataram que altas concentrações de IL-1 dentro do microambiente tumoral estão associadas a um fenótipo tumoral mais agressivo (Yang *et al.*, 2007). A ILB1 teve a sua expressão aumentada nos tratamentos com as pectinas modificadas nas duas linhagens celulares.

A proteína EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), atua como um potente fator mitogênico, desempenhando importante papel no crescimento, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares. A desregulação deste gene tem sido associada ao crescimento e progressão de certos tipos de câncer. Em um estudo recente o EGF induziu EMT (transição epitélio mesenquimal) em células cancerígenas colorretais e melhorou a capacidade de migração e invasão celular. O EGF regulou positivamente a expressão de E-caderina nas células cancerígenas colorretais (Huang *et al.*, 2020). A expressão deste gene não sofreu alterações significativas após os tratamentos nas células HCT116. Na linhagem HT 29, entretanto, podemos observar o aumento da sua expressão nas amostras tratadas com pectina de chuchu e maracujá modificadas (CH FSA ME e MA FSA ME).

CCNB1IP1 é um membro da família da E3 ubiquitina ligase que atua como fator de progressão celular durante a fase G2-M. A superexpressão causa atraso na entrada na mitose. Podemos notar uma diminuição da expressão desse gene nas amostras FSA ME nas células HCT116 e um discreto aumento nas frações FSA EM tanto nas células HCT116 como nas HT29. Esses aumentos nas frações FSA EM podem ter contribuído para o efeito citostático dessas pectinas na análise do ciclo celular.

As proteínas que regulam o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), bem como alguns dos alvos da mTOR quinase, são superexpressos ou mutados no câncer. A inibição da mTOR leva a níveis aumentados do inibidor de quinase 2 dependente de ciclina (CDK2), p27, um inibidor da progressão do ciclo celular na fase G1-S (Law *et al.*, 2002). A determinação da eficácia da inibição da mTOR no tratamento de vários tipos de câncer ainda está sendo avaliada, mas esta inibição pode se revelar um tratamento eficaz para o câncer (Easton & Houghton, 2006). Houve uma inibição significativa na expressão desse gene nas células HCT116 tratadas com as frações FSA ME de chuchu, mamão e maracujá, o que não ocorreu na linhagem HT 29.

#### **8.14.3 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a fatores de transcrição**

O papel do NF $\kappa$ B na iniciação do câncer humano, desenvolvimento, metástase e resistência ao tratamento chamou a atenção para esse gene em particular. Um número significativo de cânceres em humanos tem atividade constitutiva de NF $\kappa$ B devido ao microambiente inflamatório e várias mutações oncogênicas. A atividade do NF $\kappa$ B não apenas promove a proliferação de células tumorais, suprime a apoptose e atrai a angiogênese, mas também induz a transição epitélio-mesenquimal, o que facilita a metástase. A supressão do NF $\kappa$ B em células mieloides ou células tumorais geralmente leva à regressão tumoral, o que torna a via NF $\kappa$ B um alvo terapêutico promissor (Yifeng *et al.*, 2014).

O NF $\kappa$ B1 (p105/p50) é uma das cinco subunidades do NF $\kappa$ B, amplamente implicadas na carcinogênese, em alguns casos atuando na progressão do câncer e em outros agindo como supressor de tumor (Concetti & Wilson, 2018). Não foi observada nenhuma alteração significativa nesse gene nas células HT29



tratadas, já nas HCT116 encontramos um aumento de expressão nas amostras, MM FSA e MA FSA e CH FSA EM e uma discreta diminuição de expressão nas frações FSA ME dos frutos.

#### ***8.14.4 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a degradação da matriz celular***

Proteínas da família das metaloproteinases (MMP) estão envolvidas na quebra da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como o desenvolvimento embrionário, a reprodução e remodelação tecidual, além de em processos patológicos, como artrite e metástase. MMPs como a MMP9 podem estar envolvidas no desenvolvimento de várias malignidades, pois a degradação do colágeno IV na membrana basal e na matriz extracelular facilita a progressão do tumor, incluindo invasão, metástase, crescimento e angiogênese. A superexpressão de MMP-9 tem sido frequentemente observada em diferentes tumores malignos. Muitos estudos exploraram o MMP-9 como um biomarcador para diferentes tipos de câncer (Huang, 2018). A expressão do gene MMP9 aumentou consideravelmente nas amostras de chuchu (CH FSA EM) e de maracujá (MA FSA ME).

#### ***8.14.5 Efeitos dos polissacarídeos na expressão de genes ligados a adesão celular***

O gene CDH1 está envolvido na produção de E-caderina, cuja função é auxiliar as células na adesão celular para formarem tecidos organizados. A E-caderina está envolvida na transmissão de sinais químicos dentro das células, controlando a maturação, o movimento das células e regulando a atividade de certos genes. Portanto, também atua como uma proteína supressora de tumor. Este gene teve sua expressão aumentada nos tratamentos com chuchu, fração

FSA EM nas duas linhagens celulares testadas e expressão diminuída nas frações FSA ME das células HCT 116.

Vários estudos estabeleceram uma associação entre a carcinogênese e a inflamação crônica. É sabido que irritações constantes nos tecidos podem originar tumores que posteriormente se transformam em malignos. O processo inflamatório é um mecanismo de defesa do organismo contra agressões, sendo o responsável por mediar a sinalização molecular, interferindo na produção de citocinas, fatores de crescimento e enzimas que atuam na matriz celular.

Os resultados da análise de qPCR demonstram um estímulo na expressão de genes pró inflamatórios, esse aumento na expressão pode ter sido a causa da ativação da cascata inflamatória induzindo a apoptose das células de câncer colorretal tratadas com as pectinas.

## **9. CONCLUSÕES**

As pectinas modificadas de chuchus, mamões e maracujás parecem exercer uma atividade antitumoral em tratamento de linhagens de câncer colorretal *in vitro*. O processo de modificação química das pectinas diminuiu o peso molecular e tornou as frações mais solúveis em água, possivelmente aumentando os efeitos biológicos *in vitro*, tais como a inibição de GAL-3 e a diminuição da manutenção de viabilidade celular *in vitro*. As frações pécticas que foram modificadas quimicamente tiveram seu tamanho molecular reduzido e grau de esterificação diminuído, resultando em uma maior liberação de homogalacturonanos e na bioatividade.

Os polissacarídeos estudados parecem diminuir consideravelmente a viabilidade celular de forma dose dependente através de múltiplos mecanismos. As

pectinas, além do baixo efeito citotóxico nas linhagens celulares analisadas, também atuam de forma citostática no ciclo celular. Essa parada no ciclo celular, provavelmente, deve-se ao fato das pectinas alterarem a expressão de genes relacionados com a apoptose, regulação, migração, diferenciação e proliferação celular. A modificação química das pectinas (frações FSA ME) parece ter aumentado os seus efeitos biológicos, promovendo a indução das células à apoptose tardia. A ação das pectinas na análise da expressão gênica ocorreu de forma diferente dependendo do tipo celular analisado e do tipo de amostra, modificada ou não. Os resultados aqui apresentados demonstraram, pela primeira vez, que pectinas extraídas de frutos como chuchus, mamões verdes e maracujás, quando modificadas quimicamente, melhoram a atividade biológica *in vitro*, aumentando as possibilidades do surgimento de novos tipos de suplementos alimentares que possam ser utilizados como inibidores da GAL-3.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Report*. 2003; 5(6):492-499.
- Benians, T. A. S. (2012). *In situ analysis of cotton fibre cell wall polysaccharides*. University of Leeds.
- Bernaude, Fernanda Sarmiento Rolla and Rodrigues, Ticiania C..Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013, vol.57, n.6, pp. 397-405. ISSN 0004-2730. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302013000600001>.
- Buckeridge, M.S.; Tiné, M.A. Composição polissacarídica: estrutura da parede celular e fibra alimentar. In: *Fibra dietética in Iberoamérica: tecnologia y salud*. São Paulo: Sarvier, 2001. p.27-38.
- Califice, Stéphane, Vincent Castronovo, and Frédéric Van Den Brûle. "Galectin-3 and cancer." *International journal of oncology* 25.4 (2004): 983-1075.
- Caporaso, J. G.; Bittinger, K.; Bushman, F. D.; DeSantis, T. Z.; Andersen, G. L.; Knight, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 2010, 26, 266–7.

- Carrington, C. M. S.; Greve, C.; Labavitch, J. M. Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit. *Plant Physiol.* 1993, 103, 429–434.
- Cavalcanti, Maria Lúcia Ferrari. "Fibras alimentares." *Rev. nutr. PUCCAMP* 2.1 (1989): 88-97.
- Cheng, H., Li, S., Fan, Y., Gao, X., Hao, M., Wang, J., ... & Zhou, Y. (2011). Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells. *Medical oncology*, 28(1), 175-181.
- Cheng, H.; Zhang, Z.; Leng, J.; Liu, D.; Hao, M.; Gao, X.; Tai, G.; Zhou, Y. The inhibitory effects and mechanisms of rhamnogalacturonan I pectin from potato on HT-29 colon cancer cell proliferation and cell cycle progression. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2013, 64, 36–43.
- Chen, X. M., Bai, Y., Zhong, Y. J., Xie, X. L., Long, H. W., Yang, Y. Y., ... & Wang, X. H. (2013). Wogonin has multiple anti-cancer effects by regulating c-Myc/SKP2/Fbw7 $\alpha$  and HDAC1/HDAC2 pathways and inducing apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549. *PLoS One*, 8(11).
- Cummings, J. H., and A. M. Stephen. "Carbohydrate terminology and classification." *European Journal of Clinical Nutrition* 61 (2007): S5-S18.
- Cybulska, J., Zdunek, A., & Koziół, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43, 41-50.
- Das, S. K., Hashimoto, T., Shimizu, K., Yoshida, T., Sakai, T., Sowa, Y., ... & Kanazawa, K. (2005). Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1726(3), 328-335.
- Dalonso, N., Ignowski, E., Monteiro, C. M. A., Gelsleichter, M., Wagner, T. M., Silveira, M. L. L., & Silva, D. A. K. (2009). Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa. *Food Science and Technology*, 29(4), 793-797.
- Degterev, A., Ofengeim, D., & Yuan, J. (2019). Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(20), 9714-9722.
- Delphi, L., Sepehri, H., Khorramzadeh, M. R., & Mansoori, F. (2015). Pectic-oligosaccharides from apples induce apoptosis and cell cycle arrest in MDA-MB-231 cells, a model of human breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(13), 5265-5271.
- Emaga, T. H., Ronkart, S. N., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food chemistry*, 108(2), 463-471.
- Fabi, J. P.; Broetto, S. G.; Silva, S. L. G. L. Da; Zhong, S.; Lajolo, F. M.; Nascimento, J. R. O. Analysis of Papaya Cell Wall-Related Genes during Fruit Ripening

Indicates a Central Role of Polygalacturonases during Pulp Softening. *PLoS One* 2014, 9, e105685.

- Fabi, J. P.; Cordenunsi, B. R.; Barreto, G. P. M.; Mercadante, A. Z.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. do. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.55, p.6118-6123, 2007.
- Fabi, J.P.; Cordenunsi, B.R.; Seymour, G.B.; Lajolo, F.M.; Nascimento, J.R.O. Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 47, p. 1075-1081, 2009b.
- Fabi, J.P.; Lajolo, F.M.; Nascimento, J.R.O. Cloning and characterization of transcripts differentially expressed in the pulp of ripening papaya. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 121, p. 159-165, 2009a.
- Fabi, J. P.; Mendes, L. R. B. C.; Lajolo, F. M.; do Nascimento, J. R. O. Transcript profiling of papaya fruit reveals differentially expressed genes associated with fruit ripening. *Plant Sci.* 2010, 179, 225–233.
- Fabi, J.P.; Peroni, F.H.G.; Gomez, M.L.P.A. Papaya, mango and guava fruit metabolism during ripening: postharvest changes affecting tropical fruit nutritional content and quality. *Fresh Produce*, v. 1, p. 56-66, 2010.
- Fan, Y., Cheng, H., Li, S., Wang, J., Liu, D., Hao, M., ... & Zhou, Y. (2010). Relationship of the inhibition of cell migration with the structure of ginseng pectic polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 81(2), 340-347.
- Fang, T., Liu, D. D., Ning, H. M., Liu, D., Sun, J. Y., Huang, X. J., ... & Huang, R. M. (2018). Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through downregulation of galectin-3. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(12), 1885-1893.
- Jackson, C. L.; Dreaden, T. M.; Theobald, L. K.; Tran, N. M.; Beal, T. L.; Eid, M.; Gao, M. Y.; Shirley, R. B.; Stoffel, M. T.; Kumar, M. V.; Mohnen, D. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* **2007**, 17, 805–19.
- Martins, G. B., & da Hora, S. S. (2017). Desafios à integralidade da assistência em cuidados paliativos na pediatria oncológica do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 63(1), 29-37.
- Maxwell, Ellen G., et al. "Rhamnogalacturonan I containing homogalacturonan inhibits colon cancer cell proliferation by decreasing ICAM1 expression." *Carbohydrate polymers* 132 (2015): 546-553.
- Modified citrus pectin-monograph. *Altern Med Rev.* 2000;5:573–575.
- Nangia-Makker, Pratima, Vitaly Balan, and Avraham Raz. "Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3." *Cancer microenvironment* 1.1 (2008): 43-51.

- Gao, Xiaoge, et al. "Analysis of the neutral polysaccharide fraction of MCP and its inhibitory activity on galectin-3." *Glycoconjugate journal* 29.4 (2012): 159-165.
- Gong, H. C.; Honjo, Y.; Nangia-makker, P.; Hogan, V.; Nachman, M.; Bresalier, R.; Raz, A. The NH 2 Terminus of Galectin-3 Governs Cellular Compartmentalization and Functions in Cancer Cells The NH 2 Terminus of Galectin-3 Governs Cellular Compartmentalization and. *Cancer Res.* 1999, 59, 6239–6245.
- Gulubova, M., Aleksandrova, E., & Vlaykova, T. (2018). Promoter polymorphisms in TGFB1 and IL10 genes influence tumor dendritic cells infiltration, development and prognosis of colorectal cancer. *The journal of gene medicine*, 20(2-3), e3005.
- Gunning, A. Patrick, Roy JM Bongaerts, and Victor J. Morris. "Recognition of galactan components of pectin by galectin-3." *The FASEB Journal* 23.2 (2009): 415-424.
- Gutkoki, L.C.; Trombeta, C. Avaliação dos teores de fibra alimentar e de beta-glicanas em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, p.387-390, 1999.
- Hao, M.; Yuan, X.; Cheng, H.; Xue, H.; Zhang, T.; Zhou, Y.; Tai, G. Comparative studies on the anti-tumor activities of high temperature- and pH-modified citrus pectins. *Food Funct.* 2013, 4, 960–71.
- Huang, H. (2018). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors*, 18(10), 3249.
- Huang, K., Gao, N., Bian, D., Zhai, Q., Yang, P., Li, M., & Wang, X. (2020). Correlation between FAK and EGF-Induced EMT in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Oncology*, 2020.Reviews Cancer 17.2 (2017): 93.
- Hassimotto, N. M. a.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Identification and Characterisation of Anthocyanins from Wild Mulberry (*Morus Nigra* L.) Growing in Brazil. *Food Sci. Technol. Int.* 2007, 13, 17–25.
- INCA - Tabelas do Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis - Brasil, 17 capitais e Distrito Federal 2002-2005.
- Irwin, D. C.; Cheng, M.; Xiang, B.; Rose, J. K. C.; Wilson, D. B. Cloning, expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 3083–3091.
- Jackson, C. L.; Dreaden, T. M.; Theobald, L. K.; Tran, N. M.; Beal, T. L.; Eid, M.; Gao, M. Y.; Shirley, R. B.; Stoffel, M. T.; Kumar, M. V.; Mohnen, D. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* 2007, 17, 805–19.
- Javanmardi, J. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem.* 2003, 83, 547–550.

- Kang, M. H., & Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research*, 15(4), 1126-1132.
- Kirtchev, N., Panchev, I., & Kratchanov, C. (1989). Pectin extraction in the presence of alcohols. *Carbohydrate polymers*, 11(4), 257-263.
- Koubala, B., Kansci, G., & Mbome, L. C. M., Thibault, J., Ralet M. 2008. *Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels. Revista FoodHydrocolloids*, 22(7), 1345-1351.
- Krall, S. M., & McFeeters, R. F. (1998). Pectin hydrolysis: effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(4), 1311-1315.
- Lavi, I.; Levinson, D.; Peri, I.; Tekoah, Y.; Hadar, Y.; Schwartz, B. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85, 1977–90.
- Leclere L, Cutsem PV, Michiels C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Front Pharmacol.* 2013 Oct 8;4:128. doi: 10.3389/fphar.2013.00128.
- Li, Y.; Niu, Y.; Wu, H.; Sun, Y.; Li, Q.; Kong, X.; Liu, L.; Mei, Q. Modified apple polysaccharides could induce apoptosis in colorectal cancer cells. *J. Food Sci.* 2010, 75, H224–9.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25, 402–8..
- Mattos LL, Martins IS. Consumo de fibras alimentares em população adulta. *Rev Saúde Pública* 2000;34:50-5.
- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J., & Belshaw, N. J. (2016). Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. *Carbohydrate polymers*, 136, 923-929.
- Meyer, P. Diederick. "Nondigestible oligosaccharides as dietary fiber." *Journal of AOAC International* 87.3 (2004): 718-726.
- Nangia-Makker, P., Vitaly, B., & Avraham, R. (2012). Galectin-3-binding and metastasis. *Methods in Molecular Biology*, 878(18), 241–250. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2>.
- Ogawa, H.; Inouye, S.; Tsuji, F. I.; Yasuda, K.; Umesono, K. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the *Aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 11899–903.
- Olano-Martin, E., Rimbach, G. H., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in in vitro human colonic adenocarcinoma cells. *Anticancer research*, 23(1A), 341-346.

- Otto, Tobias, and Piotr Sicinski. "Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* 17.2 (2017): 93.
- Oyebode, O.; Gordon-Dseagu, V.; Walker, A.; Mindell, J. S. Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. *J. Epidemiol. Community Health* 2014, 1–7.
- Popkin, B.M. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World Development* 1999; 27:1905-16.
- Popkin, B.M. The nutrition transition and obesity in the developing world. *J. Nutr.*, v.131, n.3, p.871S-873S, 2001.
- Popkin, B.M. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.84, n.2, p.289-298, 2006.
- Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78(3 Suppl):S559-569.
- Salehi, F., Behboudi, H., Kavooosi, G., & Ardestani, S. K. (2018). Oxidative DNA damage induced by ROS-modulating agents with the ability to target DNA: A comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. *Scientific reports*, 8(1), 1-16.
- Sathisha, U. V., et al. "Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources." *Glycoconjugate journal* 24.8 (2007): 497-507.
- Schramm JMA, et al. Transição epidemiológica e o estudo da carga de doença no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2004;9(4):897-908.
- Seixas F.L., Fukuda D.L., Turbiani F.R.B., Garcia P.S., Petkowicz C.L.O., Jagadevan S., Gimenes M.L.. Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) By Microwave-Induced Heating. *Food Hydrocolloids*, 38 (2014), pp. 186–192
- Shiga, T. M.; Fabi, J. P.; do Nascimento, J. R. O.; Petkowicz, C. L. D. O.; Vriesmann, L. C.; Lajolo, F. M.; Cordenunsi, B. R. Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening papaya: evidence of extensive solubilization of large molecular mass galactouronides. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 7064–71.
- Shiga, T. M.; F. H. G., Peroni-Okita ; Carpita N.C. ; Lajolo, F. M.; Cordenunsi, B. R.. Polysaccharide composition of raw and cooked chayote (*Sechium edule* Sw.) fruits and tuberous roots - *Carbohydrate Polymers* Volume 130, 5 October 2015, Pages 155–165
- Silvab, Ana Karla de S. Abudc. "Extraction and Characterization of Pectin from Citric Waste." *CHEMICAL ENGINEERING* 44 (2015).
- Singleton, Vernon L., Rudolf Orthofer, and Rosa M. Lamuela-Raventós. "[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent." *Methods in enzymology* 299 (1999): 152-178.



- Slavin, J. L.; Lloyd, B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Adv. Nutr. an Int. Rev. J.* 2012, 3, 506–516.
- Sun, J., & Liu, R. H. (2008). Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11661-11667.
- Szymanska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food biophysics*, 8(1), 29-42.
- TACO – Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP - 4. ed. rev. e ampl.. -- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 161 p.
- Uenojo M., Pastore G.M., 2007, Pectinases: applications and perspectives (original title in Portuguese), *Química Nova*. 30(2), 388-394.
- Valente, V.; Teixeira, S. a; Neder, L.; Okamoto, O. K.; Oba-Shinjo, S. M.; Marie, S. K. N.; Scrideli, C. a; Paçó-Larson, M. L.; Carlotti, C. G. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol. Biol.* 2009, 10, 17.
- Van Duyn MA, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: Selected literature. *J Am Diet Assoc* 2000; 100(12):1511-21.
- Vayssade, M., Sengkhampan, N., Verhoef, R., Delaigue, C., Goundiam, O., Vigneron, P., ... & Nagel, M. D. (2010). Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytotherapy Research*, 24(7), 982-989.
- Vermelho, L. L.; Monteiro, M. F. G.; Costa, A. J. L.; Kale, P. L. Transição epidemiológica e indicadores de saúde atuais. *Cad. Saúde Coletiva*, v.9, n.2, p.111-126, 2001.
- Wang J., Yin J., Nie SP. (2020) Polysaccharides in Food. In: Xiao J., Sarker S., Asakawa Y. (eds) *Handbook of Dietary Phytochemicals*. Springer, Singapore
- Wang, X., & Lin, Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275-1288.
- Who, Joint, and FAO Expert Consultation. "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases." *World Health Organ Tech Rep Ser* 916.i-viii (2003).
- WHO. World Health Organization. *Global strategy on diet, physical activity and health*. Fifty-seventh world health assembly. [WHA57.17]. May 22, 2004.
- WHO. World Health Organization. *Prevenção de doenças crônicas: um investimento vital*. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2005.
- WHO. World Health Organization. *Global status report on non communicable diseases 2010*. Geneva: World Health Organization; 2011.
- Yan, Jun, and Aaron Katz. "PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and-

independent prostate cancer cells." *Integrative cancer therapies* 9.2 (2010): 197-203.

Yapo, B.M., 2011. Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages. *Polymer Reviews* 51, 391–413.

Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426-435.

Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., & Wallach, D. (2017). MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation. *Immunity*, 47(1), 51-65.