

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DAYANE CORREIA GOMES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO DA LECTINA EXTRAÍDA DOS CAPÍTULOS FLORAIS
DE *Egletes viscosa***

Recife

2020

DAYANE CORREIA GOMES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO DA LECTINA EXTRAÍDA DOS CAPÍTULOS FLORAIS
DE *Egletes viscosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Cavalcanti Coriolano

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Gomes, Dayane Correia

Purificação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico da lectina extraída dos capítulos florais de *Egletes viscosa* / Dayane Correia Gomes - 2020.

69 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Marília Cavalcanti Coriolano

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Lectinas 2. Purificação 3. Citotoxicidade

I. Correia, Maria Tereza dos Santos (Orientadora) II. Coriolano, Marília Cavalcanti (Coorientadora) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-064

DAYANE CORREIA GOMES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO DA LECTINA EXTRAÍDA DOS CAPÍTULOS FLORAIS
DE *Egletes viscosa***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Bioquímica e
Fisiologia da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em
Bioquímica e Fisiologia

Aprovado em: 17/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)

Prof^a. Dr^a Marília Cavalcanti Coriolano (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Jorge Luiz Neves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico

A minha mãe pela minha formação moral, por sempre estar ao meu lado, por me apoiar e sempre lutar comigo para que meus sonhos se tornem possíveis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, pela saúde e pelas oportunidades.

Aos meus pais, Cicero e Luciana, por tudo que fizeram por mim, por me fazer sempre seguir em frente e ser quem eu sou hoje.

A minha querida tia Francineide, mesmo longe sempre está me apoiando, por todo amor, carinho e apoio em todos esses anos.

A minha irmã Dayelle por toda força e apoio.

A minha orientadora professora Maria Tereza, pela imensa oportunidade que a mim foi dada, pelo apoio, pelos ensinamentos.

A Marília, minha coorientadora, pelo apoio, por sempre acreditar no meu potencial.

As minhas queridas amigas Luara Diniz e Amanda, pela amizade, pela parceria, e por tudo que me proporcionaram a minha estadia em Recife durante essa minha jornada, do pensionato para a vida.

Ao meu querido amigo Gustavo, por toda amizade, força, companheirismo e incentivo durante todo o meu percurso do mestrado.

As queridas Marcela e Thais por me ajudarem e sempre estarem disponíveis quando precisei.

A João Richards por sempre me apoiar e me dar forças frente aos problemas no decorrer dessa jornada acadêmica.

Aos professores Thiago e Jorge por me ajudarem sempre que precisei e por todo o ensinamento que adquiri durante o desenvolvimento desse mestrado.

A professora Teresinha por ceder as instalações de seu laboratório para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos Leo e Jainaldo, pela força e risos no momento de tristeza.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Carlos, Pollyanna, Poliana, Daivd, Robson e todos os demais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Mestrado.

RESUMO

Lectinas são proteínas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em vírus, bactérias, fungos, vegetais e animais. As lectinas apresentam especificidade a carboidratos e/ou glicoproteínas, são proteínas muito heterogêneas quanto a estrutura e especificidade a glicídios, características que lhes conferem grande potencial terapêutico. *Egletes viscosa* (macela) é uma planta que apresenta muitos componentes bioativos como extratos, óleos essenciais e flavonoides descritos na literatura com atividades, anti-inflamatórias, antinociceptiva, gastroprotetora e antibacteriana. O presente estudo teve como objetivo purificar, caracterizar e avaliar o potencial citotóxico da lectina extraída dos capítulos florais de *E. viscosa*. Os capítulos florais secos de *E. viscosa* foram triturados e com a farinha resultante foi realizada a extração proteica em solução de NaCl 0,15 M em agitação por 16 h, após foi realizado a precipitação proteica com sulfato de amônia na concentração de 0-20%, o precipitado da fração apresentou atividade hemaglutinante de 128. Após foi realizado purificação por cromatografia de gel filtração, obtendo dois picos, sendo que o segundo pico apresentou AH semelhante ao da fração, sendo nomeado de EgviL. A lectina após purificada foi exposta a variações de pH e variadas temperatura, EgviL se manteve estável em pH ácido e a temperatura de 60°C, em ensaios de eletroforese SDS-PAGE apresentou peso molecular de 28,8 kDa e ponto isoelétrico de 5,4 por focalização isoelétrica. De acordo com os ensaios de inibição a carboidratos a EgviL teve especificidade por glicose e galactose, ligação causada por forças eletrostáticas e hidrofóbicas de acordo com os resultados dos ensaios quenching de fluorescência e por ¹H RMN foi visto que a interação da lectina a galactose ocorreu por interação aos hidrogênios 1 e 6 presentes na cadeia desse monossacarídeo, dos mesmo na presença da lectina. Nos ensaios de citotoxicidade por MTT e citometria de fluxo a lectina foi citotóxica para as células leucêmica. Conclui-se que a EgviL é uma proteína ácida que apresenta afinidade para dois açúcares e citotóxica para as linhagens leucêmicas, proteína com potencial biotecnológico promissor.

Palavras-chave: Lectinas. Purificação. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Lectins are proteins widely distributed in nature and can be found in virus, bacteria, fungi, vegetables and animals. Lectins have specificity to carbohydrates and / or glycoproteins, they are very heterogeneous proteins in terms of structure and specificity to glycid, characteristics that give them great therapeutic potential. *Egletes viscosa* (macela) is a plant that has many bioactive components such as extracts, essential oils and flavonoids with activities, anti-inflammatory, antinociceptive, gastroprotective and antibacterial. The present study aimed to purify, characterize and evaluate the cytotoxic potential of lectin extracted from the floral chapters of *E. viscosa*. The dry floral chapters of *E. viscosa* were crushed and with the resulting flour protein extraction was carried out in 0.15 M NaCl solution under stirring for 16 h, after protein precipitation with ammonium sulfate at a concentration of 0-20 %, the fraction precipitate showed hemagglutinating activity of 128. After purification was performed by gel filtration chromatography, obtaining two peaks, the second peak having AH similar to that of the fraction, being named EgviL. The purified lectin was exposed to pH variations and varied temperatures, EgviL remained stable in acid pH and the temperature of 60 ° C, in SDS-PAGE electrophoresis assays had a molecular weight of 28.8 kDa and an isoelectric point of 5, 4 by isoelectric focusing. According to the carbohydrate inhibition tests, EgviL had specificity for glucose and galactose, binding caused by electrostatic and hydrophobic forces according to the results of the fluorescence quenching tests and by ¹H NMR it was seen that the interaction of lectin with galactose occurred by interaction with hydrogens 1 and 6 present in the chain of this monosaccharide, even in the presence of lectin. In MTT cytotoxicity and flow cytometry assays, lectin was cytotoxic to leukemic cells. It is concluded that EgviL is an acidic protein that has an affinity for two sugars and cytotoxic for leukemic strains, a protein with promising biotechnological potential.

Keywords: Lectins. Purification. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 -Esquema ilustrativo da atividade hemaglutinante das lectinas.	16
Figura 2 -Representação ilustrativa da classificação dos grupos de lectinas.	17
Figura 3 - Ensaio de inibição a carboidrato. Lectinas interagindo com os carboidratos presentes na superfície das hemácias (A), lectinas inibidas quando expostas aos glicídios (B).	19
Figura 4 - Egletes viscosa conhecida como “macela” ou “macela-da-terra” (A) e capítulos florais secos (B) parte aérea da planta utilizada e comercializada pela população.	22

ARTIGO

Figura 1 - Purificação da lectina dos capítulos florais de Eglestes viscosa por cromatografia de exclusão molecular, usando NaCl 0,15 M, foram aplicados 1,0 mL do precipitado da fração 0-20%, a leitura do coletado foi realizada em 280nm.....	45
Figura 2 - (A) Separação molecular da EgviL por eletroforese desnaturante SDS-PAGE, apresentando apenas uma banda polipeptídica e os marcadores moleculares padrão. (B) Eletroforese bidimensional (focalização isoeletrica) mostrando apenas um ponto (EgviL)..	446
Figura 3 - (A) Alteração da estabilidade da EgviL após ser exposta ao aquecimento de 30-100°C (B) Exposição a diferentes pH, mostra que a atividade hemaglutinante da EgviL em diminui em pH alcalino.....	457
Figura 4 - (A) Intensidade de fluorescente da titulação da lectina com a galactose. (B) Intensidade de fluorescente da titulação da lectina com a glicose. (C) Gráfico de Stern-Volmer da interação EgviL-galactose, em diferentes temperaturas. (D) Gráfico de Stern-V da interação EgviL-glicose, em diferentes temperaturas. (E) Gráfico da constante de associação (Ka) lectina-galactose em diferentes temperaturas. (F) Gráfico da constante de associação (Ka) lectina-glicose em diferentes temperaturas.....	49

Figura 5 -. (A) Titulação da EgviL. (B) Alteração estrutural do H 1 da galactose na presença da EgviL 0-20 M em temperatura de 298 K. (C) Alteração estrutural do H 6 da galactose na presença da EgviL 0-20 M em temperatura de 298 K.	480
Figura 6 - (A-B) Absorção dos carboidratos galactose e glicose durante a titulação da EgviL por UV-Vis.	491
Figura 7 - Ensaio de citotoxicidade expostas a diferentes concentrações da EgviL (3,125-100 µg/mL) após 24 horas. (A) Viabilidade celular das células mononucleares humanas (PBMC). (B-F) Viabilidade celular em linhagens neoplásicas. Ensaio realizado em triplicata.	502
Figura 8 - Representação gráfica da avaliação de morte celular (apoptose e necrose) causada por EgviL após 24 e 48 horas. (A e C) Avaliação de apoptose causada em linhagem neoplásica HL-60 tratadas com concentrações de 22 e 44 µg/mL. (B e D) Avaliação de apoptose causada em linhagem neoplásica Jurkat E6-1 tratadas com concentrações de 12,05, 24,1 e 48,2 µg/mL	524
Figura 9 - Avaliação da capacidade da EgviL causar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial após 24 e 48 horas. (A e C) Células de linhagem HL-60 tratadas e não tratadas após 24 e 48 horas. (B e D) Células de linhagem Jurkat E6-1 tratadas e não tratadas após 24 e 48 horas.	5355

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1- Purificação da lectina EgviL dos capítulos florais de <i>Egletes viscosa</i>	45
Tabela 2- Parâmetros termodinâmicos da interação EgviL-galactose/glicose.....	48
Tabela 3- Os dados se referem a concentração que inibe o crescimento de 50% (IC50) das células e o índice de seletividade, dados obtidos através dos ensaios de citotoxicidade por MTT.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.2.	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral.....	14
1.1.2	Objetivos.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	LECTINAS	15
2.1.1.	Classificação das lectinas vegetais	16
2.2	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS	17
2.3	CITOTOXICIDADE.....	20
2.4	EGLITES VISCOSA (L.) LESS (MACELA-DA-TERRA)	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA.....	24
3.2	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AH), INIBIÇÃO POR CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS.	24
3.3	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	25
3.4	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE E ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	25
3.5	ENSAIO DE RESISTÊNCIA A TEMPERATURA, PH E ESTÍMULO NA PRESENÇA DE ÍONS.....	26
3.6	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO POR QUENCHING DE FLUORESCÊNCIA.....	27
3.7	ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	28
3.8	INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO POR ¹ H NMR.....	28
3.9	CULTURA CELULAR E ENSAIO DE VIABILIDADE POR BROMETO DE 3- (4,5-DIMETIL-2-TIAZOLIL) -2,5-DIFENIL-2H-TETRAZÓLIO (MTT)	28
3.9.1	Ensaio da Avaliação da Viabilidade Celular por Meio da Marcação por Anexina-FITC e Iodeto de propídeo.....	29
3.10	ANÁLISE DO EFEITO DA LECTINA SOBRE POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$ M).	30
3.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
4	ARTIGO	31
	Lectina purificada e caracterizada dos capítulos florais de <i>Egletes viscosa</i> (EgviL): potencial citotóxico sobre células cancerígenas humanas.....	32
5	CONCLUSÃO	63
	REFERENCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para tratar, curar ou amenizar sinais e sintomas de enfermidades ocorre desde tempos remotos. A química de produtos naturais, especialmente de plantas utilizadas na medicina popular, é uma importante linha de pesquisa para a elucidação e descoberta de novos compostos terapêuticos (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Assim, o campo biotecnológico tem investigado compostos bioativos extraídos de fontes naturais ou recombinantes com capacidade terapêuticas e de diagnósticos, devido a notória diversidade de doenças, agentes infecciosos que causam danos à saúde humana e a baixa efetividade dos fármacos comumente usados para tratamentos terapêuticos (COELHO *et al.*, 2000).

As lectinas são proteínas onipresentes na natureza com forte potencial terapêutico possuindo atividades como antibacteriana, imunomoduladora, antitumoral, entre outras (SYED *et al.*, 2016; TATSUTA *et al.*, 2018; PATRIOTA *et al.*, 2016). Sugere-se que suas atividades estão relacionadas com a capacidade dessas proteínas reconhecerem e ligarem-se reversivelmente a carboidratos (CRUZ, 2015).

Devido os primeiros relatos da existência de lectinas em vegetais, que apresentavam um alto potencial citotóxico para células, determinou-se por vários anos a ideia que esse grupo proteico tinha como característica a toxicidade (OLSNES, 2004). No entanto, com o avançar dos estudos sobre as lectinas tem se descrito na literatura diversas lectinas não tóxicas para células humanas (de SANTANA BRITO *et al.*, 2017; CORIOLANO *et al.* 2018; PROCÓPIO *et al.* , 2018) ou com grande potencial citotóxico específico frente a células cancerígenas, por induzirem mecanismos de morte celular, como apoptose e necrose (de OLIVEIRA *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2018; NASCIMENTO-NETO *et al.*,2018).

A purificação de lectinas se inicia mediante a preparação do extrato bruto, podendo-se ser realizado a partir de órgãos, tecidos, células ou de qualquer parte que se tenha a proteína de interesse. O processo de purificação acontece por várias etapas: a primeira é a identificação da presença dessa proteína no material biológico através de uma técnica simples e de fácil realização chamada atividade hemaglutinante, permitindo avaliar a capacidade de aglutinação dos eritrócitos (NELSON; COX, 2011; THAKUR *et al.*, 2007).

A seguinte etapa é a realização da purificação por métodos cromatográficos como, exclusão por peso molecular, troca iônica e por afinidade, após o isolamento da lectina é

realizado a determinação dos parâmetros físico-químicos dessa molécula, onde serão expostas a agentes desnaturantes, redutores, a diferentes faixas de pH e temperatura, com o objetivo de verificar a estabilidade proteica. Para avaliar o peso molecular se realiza métodos de eletroforeses, em condições desnaturante Dodecil-Sulfato de sódio (SDS) que causa a separação devido a presença de campo elétrico e assim a separação ocorrer pela diferença de peso molecular e eletroforese bidimensional permite a separação e identificação do peso molécula e ponto isoelétrico (focalização isoelétrica) (NELSON; COX, 2011; COELHO *et al.*, 2012 NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Egletes viscosa, popularmente conhecida por “macela ou macela da terra”, pertence à família Asteraceae (Compositae) e sua utilização na medicina acontece através do uso de chás e infusões feitos dos capítulos florais, folhas, caules e raiz, que apresentam propriedades antibacterianas, antiespasmódicas, gastroprotetora, comprovadas na literatura (MATOS, 2006; SILVA-FILHO *et al.*, 2007). Diante as propriedades já reladas de *E. viscosa*, a presente pesquisa relata a purificação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico para células normais e cancerígena de uma lectina extraída dos capítulos florais de *E. viscosa*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Purificar, caracterizar e avaliar o potencial citotóxico de lectina extraída dos capítulos florais de *Egletes viscosa*.

1.2.2 Objetivos

- a) Estabelecer protocolo de purificação da lectina dos capítulos florais de *E. viscosa* (EgviL).
- b) Avaliar a especificidade de ligação de EgviL a carboidratos e glicoproteínas.
- c) Caracterizar a lectina por métodos físico-químicos.
- d) Determinar o peso molecular por SDS-PAGE e ponto isoeletrico por focalização isoeletrica (FIE) de EgviL.
- e) Determinar parâmetros termodinâmicos de interação EgviL-carboidratos/glicoproteínas e avaliar alterações conformacionais devido essa ligação.
- f) Elucidar o ponto de ancoramento de interação de EgviL a carboidratos/glicoproteínas.
- g) Verificar o potencial citotóxico de EgviL em células normais humanas (PBMC) e cancerígenas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

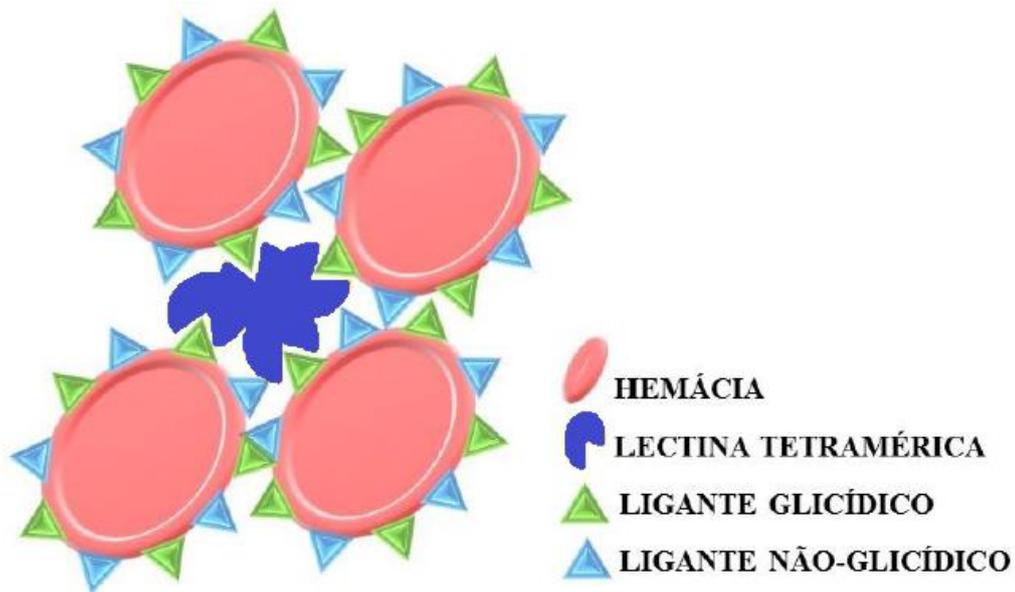
2.1 LECTINAS

Lectinas, são um grupo de proteínas muito heterogêneo que se ligam reversivelmente a carboidratos e apresentam a capacidade de aglutinar vários tipos de células. Estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas desde vírus a humanos. (LORIS, 2002; SANTI-GADELHA *et al.*, 2012).

Essas proteínas apresentam funções importantes para o sistema biológico dos organismos. Por exemplo, as lectinas de plantas atuam na defesa contra fitopatógenos e auxiliam na fixação do nitrogênio, em microorganismos ajudam na adesão à célula hospedeira. Nos animais podem auxiliar na estimulação do sistema imunológico em defesa contra agentes invasores, migração celular e apoptose (KILPATRICK, 2002; BASU *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2015).

O primeiro relato da existência de lectinas de plantas ocorreu em 1888, por Stillmark ao realizar estudos de toxicidade dos extratos de *Ricinus communis* (mamona), observando a aglutinação de eritrócitos (Figura 1), causada pela presença da proteína ricina, descoberta que marcou o começo dos estudos sobre lectinas (SELL *et al.*, 2000). Alguns anos depois foi relatada uma nova proteína das sementes de jequiriti (*Abrus precatorius*) chamada de abrina, que exercia ação aglutinante semelhante ao de ricina. Por conseguinte, ocorreu a descoberta de inúmeras proteínas tóxicas e não tóxicas de vegetais com capacidades aglutinantes (VAN DAMME *et al.*, 1998). James B. Summer, ganhador do prêmio Nobel de 1946 por cristalizar a enzima urease pela primeira vez, extraiu uma proteína cristalina com atividades aglutinantes do feijão *Conavalia ensiformis* denominando-a de Concanavalina A (Con A). Após quase duas décadas relatou-se que a Con A causava a aglutinação de eritrócitos e leveduras e precipitação do glicogênio, observaram a inibição de sua atividade hemaglutinante (AH) por sacarose. Summer e S.F Howell sugeriram que a AH possivelmente ocorria através da interação da Con A com carboidratos presentes na superfície dos glóbulos vermelhos (SHARON; GALLAGHER, 2007).

Figura 1-Esquema ilustrativo da atividade hemaglutinante das lectinas.



Fonte: Adaptado de Santana (2004).

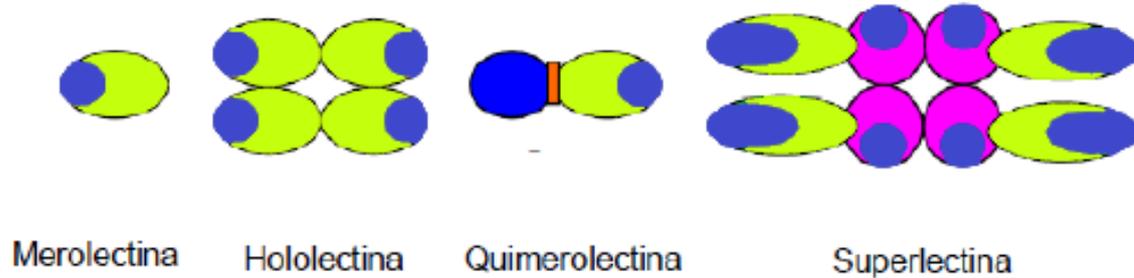
As lectinas vegetais podem ser encontradas em folhas (CAMPOS *et al.*, 2016), sementes (TORRES *et al.*, 2017), flores, caule, pistilo (VAKHANIA *et al.*, 2016), raízes (da SILVA *et al.*, 2019), casca (COSTA *et al.*, 2018) e rizoma (KABIR *et al.*, 2019).

2.1.1. Classificação das lectinas vegetais

As lectinas são classificadas de acordo com domínio de reconhecimento ao carboidrato (DRC) e a especificidade ao glicídio em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas (Figura 2).

As lectinas pertencentes ao grupo das merolectinas apresentam apenas um sítio de ligação ou reconhecimento a carboidratos, podem se ligar e causar alterações fisiológicas nas células, mas não podem aglutinar ou e/ou precipitar glicoproteína, hololectinas apresentam dois ou mais domínios de reconhecimento para um mesmo açúcares. O grupo das quimerolectinas apresenta no mínimo dois sítios um com especificidade a glicídio ou glicoconjugados e o outro com atividade distinta. As superlectinas têm dois ou mais domínios, onde podem apresentar afinidade a carboidratos diferentes (VAN DAMME *et al.*, 1998; KARNCHANATAT, 2012).

Figura 2-Representação ilustrativa da classificação dos grupos de lectinas.



Fonte: Adaptado de Karnchanatat (2012) e Van Damme *et al.* (1998)

As lectinas também podem ser classificadas de acordo com semelhança de estrutura e a sequência dos aminoácidos, sendo divididas em sete famílias em relação a estrutura e evolução: (1) Lectinas de leguminosas que apresentam características físico-química e estruturas primárias e terciária semelhantes, no entanto, apresentam a estrutura quaternária bastante variável; (2) lectinas ligantes de quitina, cujas estruturas são similares a heveína, pequena e rica em cisteína; porém, nem toda lectina que se ligue a quitina é similar a heveína; (3) proteínas inativadoras de ribossomos (RIP's), potencialmente citotóxicas, podendo inativar o ribossomo através da clivagem da ligação N-glicosídica presente no RNA; (4) Lectinas ligantes de manose em monocotiledôneas, apresentam estrutura e sequência de aminoácidos similares; (5) lectinas semelhantes à Jacalina, têm estrutura similar a jacalina extraída de *Artocarpus integrifolia*; (6) lectinas semelhantes a Amarantina, apresentam estrutura primária homóloga e não são glicosiladas; (7) lectinas de Cucurbitáceas, normalmente são glicosiladas e apresentam um sítio de ligação para quitina; (8) aglutinina de *Nicotiana tabacum*; (9) lectinas de domínio Lys M, (10) aglutinina de *Euonymus europeaus* e (11) aglutinina de *Galanthus nivalis* (DAMICO, 2002; MACEDO *et al.*, 2015).

Outro tipo de classificação para essas proteínas está relacionado a afinidade ao tipo de carboidrato, que são : (1) manose/glicose, (2) D-galactose, (3) N-acetilglicosamina, (4) L-fucose, (5) N-acetilgalactosamisa, (6) ácido N-acetil-neuramínico e (7) grupos glicanos complexos(MORENO,2008; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

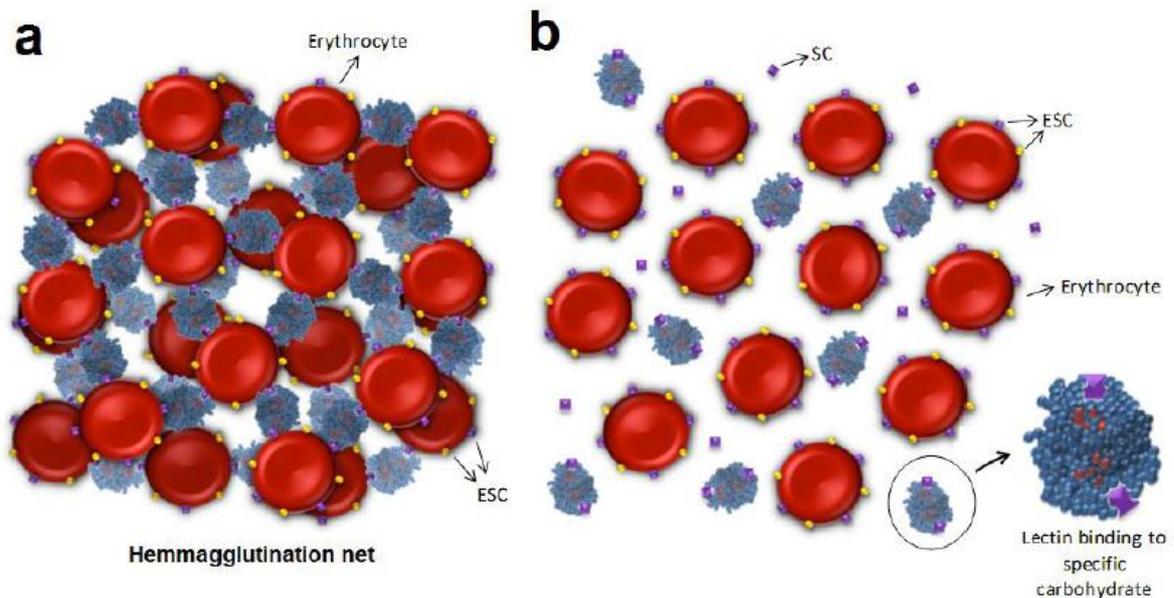
2.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS

Existem diversas técnicas de isolamento de proteínas, que fazem uso de várias características, para diferencia-las e separa-las, por meio do tamanho, cargas superficiais, hidrofobicidade e afinidade a ligantes (MORAES *et al.*, 2013). A extração de lectinas de seu ambiente biológico pode causar modificações e até o comprometimento do seu potencial bioativo, por serem expostas a condições incomuns a seu meio biológico nativo. Para averiguar se a lectina permanece bioativa após ser extraída, é realizado uma técnica simples muito utilizado, denominado a atividade hemaglutinante, para realiza-la utiliza-se uma placa de micro diluição de 96 poços de fundo “V”, a qual se realiza microdiluição da solução contendo a lectina em NaCl 0,15 M, após, é adicionado eritrócitos humano ou de coelhos (SANTOS *et al.*, 2013). A análise desse ensaio se faz através da inversão da maior diluição em que ocorreu a atividade hemaglutinante (NAPOLEÃO *et al.*, 2012).

Todavia, é de grande importância que mencionar que alguns compostos como taninos e lipídios causam dispersão dos eritrócitos e conseqüentemente ocasionam um falso positivo para a presença de lectinas em uma amostra. Para se certificar que a AH é devido a presença da lectina, faz-se necessário realizar outros métodos, um deles é a inibição da AH por carboidratos (Figura 3), neste teste a lectina será exposta a soluções contendo carboidratos por um período e passado o intervalo de incubação, é adicionado ao meio eritrócitos e a inibição é analisada através da observação da interação da lectina aos carboidratos presentes nas superfícies das membranas dos eritrócitos e aos carboidratos das soluções (PAIVA *et al.*, 2013).

A próxima etapa é chamada de caracterização parcial, nesta etapa a proteína será exposta ao aquecimento em elevadas temperatura, a agentes desnaturantes como ureia, redutores e vários pH. Ensaio que sugerem o grau de resistência a lectina apresentará frente a esses agentes físicos e químicos. A utilização do sulfato de amônio (salting out) na purificação, serve para o fracionamento por precipitação remoção da camada de solvatação dos polipeptídios sem causar danos em sua estrutura ou perda de estabilidade (DELATORRE *et al.*, 2006).

Figura 3- Ensaio de inibição a carboidrato. Lectinas interagindo com os carboidratos presentes na superfície das hemácias (A), lectinas inibidas quando expostas aos glicídios (B).



Fonte: SANTOS *et al.* (2014)

O próximo passo é a purificação por métodos cromatográficos, etapa que eleva o grau de pureza da proteína. As lectinas podem ser isoladas através de cromatografias por exclusão molecular (cromatografia de gel filtração), troca iônica (cargas líquidas), por afinidade (ligação a carboidratos) (SANTI-GADELHA *et al.*, 2012).

A cromatografia por afinidade requer interações altamente específicas da lectina, onde o ligante é imobilizado a matriz porosa, suporte insolúvel ou a qualquer outro componente adsorvido. A lectina retida a matriz pode ser eluída com soluções que causem instabilidade nas ligações entre componente-ligante. Troca iônica é utilizada para purificar proteínas através da adsorção de grupos eletricamente carregados com cargas opostas imobilizados em fase sólidas. A purificação por gel filtração, causa a separação por tamanho desses polipeptídios, quando se encontram em fase móvel estacionária porosa sofrem partição, onde as moléculas menores penetram nos microporos o que retardam o seu percurso e as maiores não penetram nas microsferas e logo são rapidamente excluídos da coluna (MONZO *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas de purificação está a eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE, que causa a separação das moléculas quanto ao peso molecular através da existência de um campo elétrico. O gel apresenta malhas com tamanhos diferentes dependendo da concentração de poli-acrilamida e bis-acrilamida (PAIVA *et al.*, 2011). Eletroforese em

condições nativas para averiguar se a lectina é de caráter ácida ou básica e eletroforese bidimensional, tem o intuito de separar as proteínas por ponto isoelétrico e por peso molecular (GÖRG, 2009).

A fluorimetria vem sendo usada atualmente para desvendar modificações na estrutura terciária da proteína, quando expostas a agentes desnaturantes que causam a mudança do padrão de absorção e emissão da fluorescência. Existindo dois tipos de cromóforos de macromoléculas sendo os intrínsecos pertencem a estrutura da proteína, e o extrínseco que se adiciona ao sistema (MESQUITA, 2010). Através de quenching de fluorescência permite descobrir os parâmetros termodinâmicos da ligação lectina-carboidratos, como o tipo de interação, constante de ligação, números de sítios de ligação e quais tipos de ligações envolvidas como forças hidrofóbicas, Van der Waals, eletrostáticas e pontes de hidrogênio, por utilização do ensaio de quenching de fluorescência (LAKOWICZ, 2013).

2.3 CITOTOXICIDADE

Morte celular é um mecanismo que há muito tempo foi considerado um processo degenerativo passivo, onde ocorrem alterações na membrana fazendo-a perder sua integridade, o que causa aumento no volume citoplasmático e conseqüentemente a perda da atividade celular (LIN *et al.* 2000). É um processo fisiológico normal para que haja um equilíbrio entre a proliferação e perda celular permitindo a manutenção tecidual de um organismo. No entanto, o processo de morte nem sempre é passivo, existindo o mecanismo de morte programada que pode ser exercida por organismos multicelulares sendo capazes de programar ou regular os estímulos intra e extracelulares (EDINGER; THOMPSON 2004).

A morte celular pode ser definida de acordo com as características morfológicas das células sem atividade celular (mortas). A morte celular programada (MRC) pode apresentar respostas adaptativas e mal-adaptativas frente a perturbações que prejudicam a homeostase celular o que desencadeia sua morte como forma de adaptação a uma falha (NAPOLETANO *et al.* 2019).

Dessa forma, existem dois tipos de morte celular: apoptose e necrose. Apoptose é denominado de morte celular programada, mecanismo que elimina células maduras sem alterar a ontogênese, a citoarquitetura e nem a função (KERR *et al.*, 1972). Quando se ocorre alguma

alteração desse mecanismo causa o desenvolvimento de enfermidades graves, como câncer, doenças neurodegenerativas, autoimunes, isquemia e entre outras (SAIKUMAR ET AL. 1999).

Assim, as células ficam arredondadas com diminuição do volume celular devido a perda de íons e água, conseqüentemente há a distensão do retículo endoplasmático e ocasionalmente a fusão das cisternas com a membrana plasmática (KING; CIDLOWSKI., 1998). Há fragmentação do DNA nuclear, perda da aderência a matriz extracelular e com formação de corpos apoptóticos sem induzir processos inflamatórios por serem fagocitados de forma rápida pelos macrófagos(ZIEGLER; GROSCURTH 2004).

Para ocorrer apoptose existe duas vias de ativação que são a via intrínseca ou mitocondrial e a extrínseca ou citoplasmática. A ativação da via mitocondrial é através de sinalização que indicam danos no DNA e a falta de fatores de crescimento, devido a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) após ser formado o complexo protéico BAX e BAK (Wong 2011), permitindo a liberação do citocromo C que ativa o fator de ativação associada a protease apoptótica 1 (APAF-1) e pró-caspase 9, assim, formando uma holoenzima, quando a apoptosomo está na presença de ATP/dATP desencadeia ativação de caspase 9 e conseqüente as caspases 3 e 7, que ocasiona a morte celular (SANKARI *et al.*,2012).

A ativação da via extrínseca ocorre devido a ligação do TNF- α aos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), após ligação há a ativação a molécula FADD/MORT-1 (proteína do domínio de morte associado ao Faz), que recruta a caspase 8 para ativar a caspase 3 em seqüência desencadeia a morte celular (BUDIHardjo *et al.* 2002). A caspase 8 e 10 ativam as caspases 3, 6 e 7 que finalizam o processo apoptótico (FRANCISCHETTI *et al.* 2010).

A morte celular por necrose é um processo causado por agentes tóxicos, traumas diretamente na célula ou fragmentação da membrana citoplasmática (KROEMER 1997). Ocasionalmente o aumento do volume celular, desorganização do citoplasma, agregação de cromatina, perda da membrana do citoplasma e conseqüente rompimento celular, assim, havendo extravasamento de todo o conteúdo intracelular para o meio externo, o que irá causar danos nas células vizinhas e desencadear processo inflamatório (ZIEGLER;GROSCURTH 2004).

Dessa forma, vários estudos são realizados para averiguar a indução de morte e o tipo de morte tanto em células normais como em células cancerígenas. (SINHA *et al.* 2017). A primeira ideia formada nas primeiras descobertas da existência das lectinas era o potencial citotóxico como propriedade específica para esse grupo. Porém, vários estudos relatam a

existência de lectinas não tóxicas para células normais, sendo citotóxicas para células tumorais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; de SANTANA BRITO *et al.*, 2017; PATRIOTA *et al.*, 2016).

2.4 EGLETES VISCOSA (L.) LESS (MACELA-DA-TERRA)

A *Egletes viscosa* (figura 1A), comumente encontrada no Nordeste do Brasil, pertence à família Asteraceae, terceira maior família das angiospermas, com aproximadamente 24.000 espécies, compostas por 1.700 gêneros distribuídos em 17 tribos e três subfamílias (PETACCI *et al.*, 2012). Várias espécies dessa família são consideradas cosmopolitas, podem ser encontradas em todos os climas e habitats, sendo abundantes em regiões campestres, montanhosas, raramente em formações florestais, estando presentes em larga escala no continente sul-americano (VOLPE *et al.*, 2006). Apresenta crescimento abundante nas planícies de inundações, margens de lagoas, açudes, cursos de água do sertão, em período de seca após a baixa das águas.

A *E. viscosa* é uma planta herbácea, pequena, de sabor amargo, aromática, de produção anual, com cerca de 2-15 cm de comprimento no ápice dos ramos, involúcro largo campanulado, brácteas pilosas, lanceoladas e agudas com capítulos isolados no ápice dos ramos (GUEDES *et al.*, 2008).

Os capítulos florais secos (figura 4B), são utilizados na medicina popular para tratar enfermidades como cólicas, gases, dispepsia, por ser antiespasmódica (DE AQUINO *et al.*, 2015) relaxante muscular e antiviral, hepatoprotetora, gastroprotetora, antiperoxidativa, antinociceptiva, antitrombótica e anti-inflamatória (GUEDES *et al.*, 2008; ZERAIK, 2010)

Figura 4- *Egletes viscosa* conhecida como “macela” ou “macela-da-terra” (A) e capítulos florais secos (B) parte aérea da planta utilizada e comercializada pela população.



Fonte: Autora.

De Aquino *et al.* (2015) realizaram estudos antibacterianos com os extratos hexânico e metanólico das flores secas de *E.viscosa* associados a aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, frente a cepas bacterianas resistentes. O extrato metanólico apresentou sinergismo significativo frente as cepas testadas, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*. Já o extrato hexânico apresentou atividade sinérgica significativa frente as bactérias *P. aeruginosa* e *E. aerogenes*, segundos os autores a diferença entre os resultados se dão devidos os compostos presentes em cada extrato.

Além dos estudos realizados com extratos das flores de *E. viscosa*, Rao *et al*, (1996) isolaram o composto ternatina (flavonoide) das flores para a avaliação do potencial gastroprotetora in vivo, com base nos resultados obtidos concluíram que a ternatina inibia o trânsito intestinal, secreções e motilidade, sugerindo inibição da função intestinal. Os pesquisadores notaram que o composto inibiu os danos gástricos causados por etanol, e sugeriram autores discutem que esse potencial de inibição pode ocorrer por ação mediada pela interação da ternatina com receptores alfa₂ adrenérgicos e canais de cálcio. Dessa forma, concluem que a ternatina possui propriedades gastroprotetora e antidiarreicas.

Araújo *et al*, (2008) investigaram a atividade antinociceptiva e toxicológica do extrato aquoso das sementes de *E.viscosa*. O estudo demonstrou que o extrato aquoso apresentou potencial antinociceptivo e nenhum risco de acordo com os parâmetros tóxicos testados. Na avaliação das atividades antinociceptiva, anticonvulsivante e antibacteriana realizadas do óleo essencial dos capítulos florais frescos, foi detectado efeito analgésico contra a nocicepção induzida por ácido acético e formalina, porém não apresentou efeito para a nocicepção por chapa quente, apresentando potencial anticonvulsivante e antibacteriano. Em estudos realizados com a ternatina também foi revelado flavonoide isolado da macela, apresenta efeitos antitrombóticos (LIMA *et al.*, 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA.

Os capítulos florais secos de *Egletes viscosa* foram coletados em Caririáçu-Ceará (Brasil), uma exsicata da planta foi depositada no herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL-URCA) apresentando o número de identificação (12.831).

Os capítulos florais secos foram triturados e em seguida, foi obtido o extrato salino a 5%, a extração proteica ocorreu sob agitação por 16 horas em NaCl 0,15M. O extrato foi filtrado e fracionado por sulfato de amônio nas saturações de 0 - 20 a 0 -100% por 4 horas. As frações foram centrifugadas a 3600 rpm por 15 min, depois os precipitados e sobrenadantes correspondentes a cada fração foram dialisados por 4 horas contra água destilada e NaCl 0,15M. Dosagem de proteínas e atividade hemaglutinante foram realizados como descrito a seguir.

A purificação da lectina (EgviL) foi realizada utilizando cromatografia de exclusão de peso molecular em matriz Sephadex® G-75 (Sigma-Aldrich) e aplicou-se à coluna 1,5 mL de precipitado da fração 0-20% (1,0 mg de proteína). A amostra foi eluída com NaCl 0,15M e a absorbância foi medida a 280 nm em um espectrofotômetro (Gene Quant 1300). Após, os picos obtidos tiveram sua concentração de proteínas medida e foi realizado a atividade hemaglutinante.

3.2 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AH), INIBIÇÃO POR CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS.

Os testes de AH foram realizados em uma placa de microtitulação de 96 poços (Kartell S.P.A., Itália), usando eritrócitos glutarizados a 2,5% (v / v). A coleta de eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo 23076.033782 / 2015-70). Foi realizada microdiluição seriada da amostra (50µL) em NaCl 0,15 M, após adição de 50µL da suspensão de eritrócitos e incubado a 25 ° C por 45 min. Para o controle negativo, foram adicionados ao poço apenas NaCl 0,15 M e eritrócitos, as unidades de AH (UAH) foram calculadas em relação ao valor da maior diluição da amostra que apresentou aglutinação de eritrócitos. AH específica é a razão entre UAH e concentração de proteína (mg / mL).

Seguindo a purificação da EgviL, foi analisado o efeito dos carboidratos na capacidade de aglutinação dos eritrócitos de coelho (atividade hemaglutinante, AH). Para a inibição da AH, a lectina foi adicionada aos poços contendo os carboidratos (0,2M) 50µL, incubados por 15 min, depois foram adicionados os eritrócitos. Monossacarídeos (200 mM) fucose, glicose, galactose, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, N-acetil-manosamina, o dissacarídeo maltose (200 mM) e as glicoproteínas (0,5 mg / mL) de albumina e fetuína.

3.3 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A mensuração da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Lowry et al [16], usando uma curva padrão de albumina bovina (31,25–500 mg / mL).

3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE E ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

400 µg de lectina foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (p / v) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli [15]. O peso molecular do EgViL foi determinado em relação às bandas de polipeptídeos da amostra e marcadores padrão de massa molecular (12–225 kDa; GE Healthcare Life Sciences, Suécia). Sendo corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,02% (p / v) em ácido acético a 10%.

A eletroforese bidimensional foi realizada para determinar o ponto isoelétrico da EgviL. A lectina (400µg) foi solubilizada em tampão de reidratação (2% p / v hidrato de 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanossulfonato [CHAPS], tampão IPG 1% v / v pH 3-10 e 0,002% w / v azul de bromofenol) e esta solução foi aplicada à tira para ser reidratada (7 cm; gradiente linear pH 3-10) por 16 horas a 28 ° C. O FEI foi realizado em um sistema Ettan IPGPhor III (GE Healthcare Life Sciences , Suécia) a 25 ° C. Após a tira adicionada em gel de poliacrilamida-SDS em seguida realizada a corrida, após o término foi corada com azul de Coomassie R-250 a 0,02% (p / v). Em seguida, a descoloração foi realizada, a análise foi realizada usando o software ImageMaster (GE Healthcare).

3.5 ENSAIO DE RESISTÊNCIA A TEMPERATURA, PH E ESTÍMULO NA PRESENÇA DE ÍONS.

Alíquotas de EgviL (0,5 mg. mL⁻¹ em NaCl 0,15M) foram adicionadas em microtubos (Eppendorf) e levadas para um banho de calor seco com variações de temperatura (30-100 ° C) por 30 minutos. Paralelamente, outras alíquotas na mesma concentração de lectina foram incubadas em diferentes concentrações de pH (3-12) por 24 horas. assim, alíquotas foram incubadas e expostas a soluções 10 mM de CaCl₂, MgCl₂ e KCl por 30 minutos. Foi realizado a AH da lectina para avaliar o efeito desses agentes sobre o potencial aglutinação dos eritrócitos.

3.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO POR QUENCHING DE FLUORESCÊNCIA.

Para a realização dos experimentos foi utilizado um espectrofluorímetro Jasco FP-6300, para a medição dos espectros de emissão de fluorescência, em temperaturas a 303°C, 308°C, 313°C. O aparelho foi configurado para excitar os resíduos aromáticos da proteína a 280 nm, e a emissão sendo monitorada entre 300 e 400 nm. EgviL (2,3 mM) foi titulada em doze concentrações de galactose glicose a 0,2M (0, 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255, 300 e 345 mM) constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi determinada pela razão de intensidade.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência dos carboidratos e F corresponde a intensidade da fluorescência da lectina na presença dos carboidratos, $[Q]$ é a concentração do carboidrato. Além disso, as constantes de ligação K_a foram determinadas usando a equação:

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

A realização do experimento com temperaturas variáveis possibilita a verificação do tipo de mecanismo de interação, podendo ser dinâmico quando o coeficiente angular no Stern-Volmer se eleva quando há o aumento de temperatura, ou interação estática quando o coeficiente angular decai com o aumento da temperatura. A avaliação de parâmetros termodinâmicos que estão envolvidos na ligação da EgviL aos carboidratos a partir da equação:

$$\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (3)$$

Assim a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada utilizando a equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

$R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e T a temperatura em Kelvin, variação da entalpia (ΔH) e da variação da entropia (ΔS). Parâmetros que permitem inferir a natureza de ligação gerada. Os valores $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ sugere que as ligações são formadas por forças hidrofóbicas, $\Delta H < 0$ e

$\Delta S < 0$ ligações de hidrogênio, $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ formação de ligações eletrostáticas e $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ sugerem que é uma interação espontânea e com ligações hidrofóbicas.

3.7 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Os espectros de UV-vis da proteína foram registrados em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm durante a titulação com dez concentrações (1,3 a 26 mM) de carboidratos (glicose e galactose). Assim, observando-se a alteração no pico de intensidade (*OD*) e posição no comprimento de onda de absorção de proteínas no curso da titulação.

3.8 INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO POR ^1H NMR.

A EgviL e os carboidratos (glicose e galactose) foram dissolvidos em 700 μL de água deuterada (D_2O), as soluções de carboidratos foram transferidas para tubos de RMN a uma concentração final de 13,5 mM. Os tubos de RMN contendo os compostos foram titulados com solução EgviL na faixa de concentração de 2-20 M e as alterações no desvio químico de ^1H dos açúcares foram reconhecidas e atribuídas durante a titulação.

3.9 CULTURA CELULAR E ENSAIO DE VIABILIDADE POR BROMETO DE 3-(4,5-DIMETIL-2-TIAZOLIL)-2,5-DIFENIL-2H-TETRAZÓLIO (MTT)

Foram coletados cerca de 6mL de sangue venoso periférico de voluntários doadores em tubo estéril contendo heparina (10 U/ml). Cuidadosamente, em capela de fluxo laminar, foi adicionado a uma mistura de Ficoll-Hypaque (Amersham), na proporção de 2:1 em tubos de 50

ml. Em seguida centrifugados a 400g durante 30 minutos a 20°C, um anel de PBMC foi obtido entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma. As células foram lavadas por centrifugação a 400 X g durante 30 minutos a 20°C com PBS estéril. Após foram contadas em câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan (Sigma), ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado e a cultura feita com o meio RPMI(1640), A realização da coleta sanguínea foi aprovado pelo comitê de ética com número de registro (UFPE, CAAE nº 10757519.8.0000.5208/2019).

As células cancerígenas Hela, HCT, MCF7, HI-60 e Jurkat E6-1 foram obtidas pela Sigma-Aldrich® (EUA), o cultivo das células normais e leucêmicas foram realizados em frascos de cultura em meio RPMI-1640 completo. O efeito citotóxico do composto foi avaliado por meio do ensaio de citotoxicidade de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolium). Para a realização do ensaio foram plaqueadas em placas de 96 poços 1x10⁶ de células por poço, sendo feito o tratamento com as concentrações (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg) da lectina, incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo as células foram plaqueadas somente com RPMI 1640 completo, passado as 24 horas as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com solução de MTT (Sigma-Aldrich®) a 2,5 mg/mL, em seguida incubadas por 3 horas em ausência de luz, depois foram centrifugadas, sobrenadante descartado e adição 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, e homogeneizou-se a placa, após feita leitura a em espectrofotômetro em comprimento de onda 560 nm e quantificação da coloração realizada.

3.9.1 Ensaio da Avaliação da Viabilidade Celular por Meio da Marcação por Anexina-FITC e Iodeto de propídeo.

Foram plaqueadas 3×10^5 células por poço, em placas de 48 poços. Em seguida tratadas com a EgviL nas concentrações da IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 48 horas, após as células foram lavadas com PBS gelado, em seguida com $5,0 \mu\text{L}$ anexina V e $5,0$ de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich®), incubadas fora do alcance da luz por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguida, foi realizada a análise das células tratadas e não tratadas (controle negativo) através de citometria de fluxo, os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.10 ANÁLISE DO EFEITO DA LECTINA SOBRE POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi\text{M}$).

Foram plaqueadas 3×10^5 células por poço, em placas de 48 poços. Em seguida tratadas com a EgviL nas concentrações da IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 48 horas, após as células foram lavadas com PBS gelado, após as lavagens foi adicionado $100 \mu\text{L}$ do fluorocromo Rodamina 123 (Sigma-Aldrich®), incubadas fora do alcance da luz por 30 minutos a temperatura ambiente, em seguida, foi realizada a análise das células tratadas e não tratadas (controle negativo) através de citometria de fluxo, os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

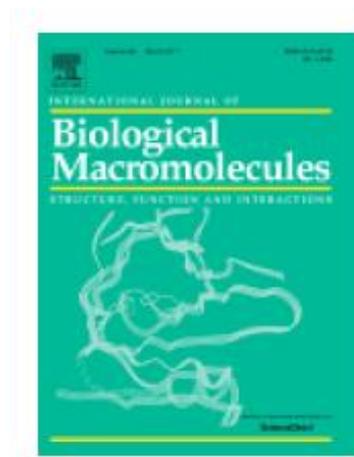
As análises estatísticas dos experimentos de citotoxicidade foram realizadas em programa GraphPad Prism 7 seguindo do pós-teste Dunnet. Os resultados expressos com média \pm SD, valores com $p < 0.05$ considerado estatisticamente significante.

4 ARTIGO

Lectina purificada e caracterizada dos capítulos florais de *Egletes viscosa* (EgviL): potencial citotóxico sobre células cancerígenas humanas.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“International Journal of Biological Macromolecules



Fator de Impacto: 4,9

Instruções para autores: <https://www.elsevier.com/journals/international/-journal-of-biological-macromolecules/0141-8130/guide-for-authors>

Lectina purificada e caracterizada dos capítulos florais de *Egletes viscosa* (EgviL): potencial citotóxico sobre células cancerígenas humanas.

Dayane Correia Gomes^a, Marcela Rodrigues Barros^b, Thaís Meira Menezes^b, Jorge Luiz Neves^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Teresinha Gonçalves da Silva^c, Marília Cavalcanti Coriolano^a, Maria Tereza dos Santos Correia^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife CEP: 50670-901, PE, Brasil.

^bLaboratório de Química Biológica, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil

^cDepartamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife CEP: 52171-11, PE, Brasil.

*Autor Correspondente.

Endereço de email: mtscorreia@gmail.com

Resumo

Lectinas são proteínas que apresentam sítio de reconhecimento a carboidratos, apresentando a capacidade de aglutinar e/ou interagir com diversos tipos celulares e sistemas biológicos, e por isso são com proteínas possuem alto potencial biotecnológico. *E. viscosa* é conhecida popularmente por “macela”, planta com propriedades terapêuticas como antibacteriana, antinociceptiva e gastroprotetora, comprovadas na literatura. O presente estudo teve como objetivo purificar, caracterizar e avaliar citotoxicidade da lectina extraída dos capítulos florais de *E. viscosa*. Dos capítulos florais secos de *E. viscosa* extraiu-se a lectina (EgviL) da fração 0-20% por gel filtração eluída com NaCl a 0,15M, em eletroforese SDS-PAGE a proteína apresentou massa molecular de 28,8 kDa e pI de 5,4 por FIE, mostrou-se estável ao aquecimento de até 60 °C. Em ensaios de inibição a glicídios ela apresentou afinidade a galactose/glicose, demonstrando ligação eletrostática e hidrofóbicas para os açúcares respectivos por ensaios de quenching de fluorescência. Em ensaio de interação proteína-carboidrato por ¹H RMN notou-se que a EgviL interagiu com os hidrogênios 1 e 6 presentes na estrutura da galactose, a lectina apresentou causou morte celular através da via apoptótica em células de HL60 e Jurkat E6-1, e estimula a produção de óxido nítrico em células normais. Concluímos que a EgviL é uma proteína de caráter ácido com afinidade a dois monossacarídeos, resistente ao aquecimento moderado e citotóxica para células neoplásicas, apresentando potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Citotoxicidade, *Egletes viscosa*, Espectrofluorescência, lectina.

1 Introdução

Lectinas são proteínas não imunológicas capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados, essas moléculas apresentam a capacidade de ligarem-se seletivamente e reversivelmente a uma variedade de carboidratos [1]. Além disso, são largamente distribuídas na natureza, estão presentes em todos os tipos de organismo desde vírus a humanos, são proteínas com estruturas diversificadas tanto em tamanho quanto em função. As lectinas são classificadas quanto a sua estrutura em quatro grupos: merolectinas, apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos; hololectinas, possuem dois ou mais sítios de ligação a açúcares; quimerolectinas, contêm um sítio de ligação específico a carboidrato e um sítio de ligação com atividade catalítica ou atividade biológica; e as superlectinas, possuem no mínimo dois sítios que podem reconhecer a carboidratos estruturalmente diferentes [2,3,4].

As lectinas são amplamente estudadas por apresentarem capacidade de aprimoramento de vários processos biológicos, como estimulação de resposta dos sistemas de defesas de um organismo contra agentes patogênicos, adesão de bactérias e fungos as células hospedeiras, potencial bactericida e/ou bacteriostático [5]. As lectinas de vegetais apresentam várias aplicações terapêuticas, biotecnológicas e biomédicas. Dentre seus potenciais terapêuticos se destacam vários estudos que demonstram atividades anticâncer, citotóxico e imunomodulador [6,7].

Dessa forma, é observado na literatura uma gama de análises citotóxicas de lectinas vegetais em células normais e cancerígenas humanas e animais. Em alguns estudos é observado o potencial tóxico dessas proteínas sobre essas células através da avaliação de externalização da fosfatidilserina (necrose) e morte celular programa (apoptose) [8,9]. Em estudos realizados com lectinas é possível observar diferenças nos perfis de citotoxicidade, podendo apresentar significância ou ausência de alteração celular, pois o grau de citotoxicidade dessas proteínas é

variável e seu potencial tóxico depende de suas especificidades de interação para as células normais e cancerígenas [10].

Egletes viscosa (Asteraceae) é uma planta anual, facilmente encontrada nas margens de rios, lagos e represas, popularmente conhecida por ‘macela’ ou ‘macela da terra’ e seus capítulos florais secos são comercializados em supermercados e lojas. Tanto a infusão quanto a tintura de *E. viscosa* são utilizadas pela a população para tratar distúrbios gastrointestinais como dores estomacais, diarreia e dispepsia [11,12]. Estudos com os extratos hexânico e metanólico das flores de *E. viscosa* demonstraram potencial modulador de aminoglicosídeos frente a cepas bacterianas padrões e multirresistentes a antibióticos. Assim, os resultados mostram que os extratos apresentam um potencial promissor contra a resistência bacteriana [13]. No entanto, há uma escassez na literatura de estudos que reportem repostas fisiológicas, agrônômicas e biotecnológicas, sendo de muita importância a realização de novas investigações sobre os princípios ativos e propriedades terapêuticas [14].

O presente estudo teve como objetivo isolar a lectina dos capítulos florais de *Egletes viscosa* (EgviL) e caracteriza-la por quenching de fluorescência e ^1H RMN (ressonância magnética nuclear), para a elucidação de parâmetros termodinâmicos de interação lectina-carboidratos (qualitativos e quantitativos) e metodologias convencionais comumente descritas na literatura para a avaliação de parâmetros físico-químicos. Por conseguinte, realizar a avaliação do potencial citotóxico da lectina em células de leucemias promielocítica HI-60 e Leucemia aguda de células T (Jurkat E6-1).

2 Materiais e Métodos

2.1. Extração e purificação da lectina.

Os capítulos florais secos de *Egletes viscosa* foram coletados em Caririaçu-Ceará (Brasil), apresentando o número de identificação (12.831) e exsiccatas depositadas no herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL-URCA).

Os capítulos florais secos foram triturados e em seguida, foi realizado extrato salino a 5% (NaCl 0,15 M), a extração proteica ocorreu sob agitação por 16 horas. O extrato foi filtrado e fracionado por sulfato de amônio nas concentrações de 0 - 20 a 0 -100% por 4 horas. As frações foram centrifugadas a 3600 rpm por 15 min, depois os precipitados e sobrenadantes correspondentes a cada fração foram dialisados por 4 horas contra água destilada e NaCl 0,15M. Dosagem de proteínas e atividade hemaglutinante foram realizados.

A purificação da lectina (EgviL) foi realizada utilizando cromatografia de exclusão de peso molecular em matriz Sephadex® G-75 (Sigma-Aldrich) e aplicou-se à coluna 1,5 mL de precipitado da fração (1,0 mg de proteína). A amostra foi eluída com NaCl 0,15M e a absorvância foi medida a 280 nm em um espectrofotômetro (Gene Quant 1300). Após, o pico de lectina teve sua concentração de proteínas medida e foi realizado a atividade hemaglutinante.

2.2. Atividade Hemaglutinante (AH), Inibição de Carboidratos e Glicoproteínas.

Seguindo a purificação da EgviL, foi analisado o efeito dos carboidratos na capacidade de aglutinação dos eritrócitos de coelho (atividade hemaglutinante, AH). Os testes de AH foram realizados em uma placa de microtitulação de 96 poços (Kartell S.P.A., Itália), usando eritrócitos glutarizados a 2,5% (v / v). A coleta de eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo 23076.033782

/ 2015-70). Foi realizada microdiluição seriada da amostra (50 μ L) em NaCl 0,15 M, após adição de 50 μ L da suspensão de eritrócitos e incubado a 25 ° C por 45 min. Para o controle negativo, foram adicionados ao poço apenas NaCl 0,15 M e eritrócitos, as unidades de AH (UAH) foram calculadas em relação ao valor da maior diluição da amostra que apresentou aglutinação de eritrócitos. AH específica é a razão entre UAH e concentração de proteína (mg / mL).

Para a inibição da AH, a lectina foi adicionada aos poços contendo os carboidratos (0,2M) 50 μ L, , incubados por 15 min, depois foram adicionados os eritrócitos. Monossacarídeos (200 mM) fucose, glicose, galactose, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, N-acetil-manosamina, o dissacarídeo maltose (200 mM) e as glicoproteínas (0,5 mg / mL) de albumina e fetuína.

2.3. Concentração de Proteínas

A mensuração da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Lowry et al [16]. Usando uma curva padrão de albumina bovina (31,25–500 mg / mL).

2.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE e Focalização Isoelétrica (FIE).

400 μ g de lectina foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (p / v) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli [15]. O peso molecular do EgViL foi determinado em relação às bandas de polipeptídeos da amostra e marcadores padrão de massa molecular (12–225 kDa; GE Healthcare Life Sciences, Suécia). Sendo corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,02% (p / v) em ácido acético a 10%.

A FIE foi realizada para determinar o ponto isoelétrico da EgviL nativa. A lectina (400µg) foi solubilizada em tampão de reidratação (2% p / v hidrato de 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanossulfonato [CHAPS], tampão IPG 1% v / v pH 3-10 e 0,002% w / v azul de bromofenol) e esta solução foi aplicada à tira para ser reidratada (7 cm; gradiente linear pH 3-10) por 16 horas a 28 ° C. O FEI foi realizado em um sistema Ettan IPGPhor III (GE Healthcare Life Sciences , Suécia) a 25 ° C. A tira foi corada com azul de Coomassie R-250 a 0,02% (p / v). Em seguida, a descoloração foi realizada, a análise foi realizada usando o software ImageMaster (GE Healthcare).

2.5. Ensaio de Resistência a Temperatura, pH e Estímulo na Presença de íons.

Alíquotas de EgviL (0,5 mg. mL⁻¹ em NaCl 0,15M) foram adicionadas em microtubos (Eppendorf) e levadas para um banho de calor seco com variações de temperatura (30-100 ° C) por 30 minutos. Paralelamente, outras alíquotas na mesma concentração de lectina foram incubadas em diferentes concentrações de pH (3-12) por 24 horas. assim, alíquotas foram incubadas e expostas a soluções 10 mM de CaCl₂, MgCl₂ e KCl por 30 minutos. Foi realizado a AH da lectina para avaliar o efeito desses agentes sobre o potencial aglutinação dos eritrócitos.

2.6. Avaliação da Interação Lectina-Carboidrato por quenching de Fluorescência.

Para a realização dos experimentos foi utilizado um espectrofluorímetro Jasco FP-6300, para a medição dos espectros de emissão de fluorescência, a 303 K, 308 K, 313 K. O aparelho foi configurado para excitar os resíduos aromáticos da proteína a 280 nm, e a emissão sendo monitorada entre 300 e 400 nm. A EgviL (2,3 mM) foi titulada em doze concentrações de

galactose glicose a 0,2M (0, 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255, 300 e 345 mM) constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi determinada pela razão de intensidade.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência dos carboidratos e F corresponde a intensidade da fluorescência da lectina na presença dos carboidratos, $[Q]$ é a concentração do carboidrato. Além disso, as constantes de ligação K_a foram determinadas usando a equação:

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

A realização do experimento com temperaturas variáveis possibilita a verificação do tipo de mecanismo de interação, podendo ser dinâmico quando o coeficiente angular no Stern-Volmer se eleva quando há o aumento de temperatura, ou interação estática quando o coeficiente angular decai com o aumento da temperatura. A avaliação de parâmetros termodinâmicos que estão envolvidos na ligação da EgviL aos carboidratos a partir da equação:

$$\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (3)$$

Assim a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada utilizando a equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

$R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e T a temperatura em Kelvin, variação da entalpia (ΔH) e da variação da entropia (ΔS). Parâmetros que permitem inferir a natureza de ligação gerada. Os valores $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ sugere que as ligações são formadas por forças hidrofóbicas, $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ ligações de hidrogênio, $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ formação de ligações eletrostáticas e $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ sugerem que é uma interação espontânea e com ligações hidrofóbicas.

2.7. Espectroscopia UV-Vis

Os espectros de UV-vis da proteína foram registrados em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm durante a titulação com dez concentrações (1,3 a 26 mM) de

carboidratos (glicose e galactose). Assim, observando-se a alteração no pico de intensidade (*OD*) e posição no comprimento de onda de absorção de proteínas no curso da titulação.

2.8. Interação lectina-carboidrato por ¹H NMR.

A EgviL e os carboidratos (glicose e galactose) foram dissolvidos em 700 µL de água deuterada (D₂O), as soluções de carboidratos foram transferidas para tubos de RMN a uma concentração final de 13,5 mM. Os tubos de RMN contendo os compostos foram titulados com solução EgviL na faixa de concentração de 2-20 M e as alterações no desvio químico de ¹H dos açúcares foram reconhecidas e atribuídas durante a titulação.

2.9. Cultura Celular e Ensaio de Viabilidade por Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

Foram coletados cerca de 6mL de sangue venoso periférico de voluntários doadores, o sangue foi coletado em tubo estéril contendo heparina (10 U/ml). Cuidadosamente, em capela de fluxo laminar, foi adicionado a uma mistura de Ficoll-Hypaque (Amersham), na proporção de 2:1 em tubos de 50 ml. Em seguida centrifugados a 400 X g durante 30 minutos a 20°C, um anel de PBMC foi obtido entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma. As células foram lavadas por centrifugação a 400 X g durante 30 minutos a 20°C com PBS estéril. Após foram contadas em câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan (Sigma), ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado e a cultura feita com o meio RPMI(1640), A realização da coleta sanguínea foi aprovado pelo comitê de ética com número de registro (UFPE, CAAE nº 10757519.8.0000.5208/2019).

As células leucêmicas de linhagem HI-60 e Jurkat E6-1 foram obtidas pela Sigma-Aldrich® (EUA), o cultivo das células normais e leucêmicas foram realizados em frascos de cultura em meio RPMI-1640 completo. O efeito citotóxico do composto foi avaliado por meio do ensaio de citotoxicidade de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo de tetrazolium). Para a realização do ensaio foram plaqueadas em placas de 96 poços 1×10^6 de células por poço, sendo feito o tratamento com as concentrações (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 μg) da lectina, incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Como controle negativo as células foram plaqueadas somente com RPMI 1640 completo, passado as 24 horas as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com solução de MTT (Sigma-Aldrich®) a 2,5 mg/mL, em seguida incubadas por 3 horas em ausência de luz, depois foram centrifugadas, sobrenadante descartado e adição 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, e homogeneizou-se a placa, após feito leitura a em espectrofotômetro em comprimento de onda 560 nm e quantificação da coloração realizada.

2.9.1. Ensaio da Avaliação da Viabilidade Celular por Meio da Marcação por Anexina (Apoptose) e Iodeto (Necrose)

Foram plaqueadas 3×10^5 células por poço, em placas de 48 poços. Em seguida tratadas com a EgviL nas concentrações da IC_{50} e $2 \times \text{IC}_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 48 horas, após as células foram lavadas com PBS gelado, em seguida com 5,0 μL anexina V e 5,0 de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich®), incubadas fora do alcance da luz por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguida, foi realizada a análise das células tratadas e não tratadas (controle negativo) através de citometria de fluxo, os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.10.2 Análise do Efeito da Lectina Sobre Potencial Transmembranar Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Foram plaqueadas 3×10^5 células por poço, em placas de 48 poços. Em seguida tratadas com a EgviL nas concentrações da IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 48 horas, após as células foram lavadas com PBS gelado, em seguida com 100 μL do fluorocromo Rodamina 123 (Sigma-Aldrich®), incubadas fora do alcance da luz por 30 minutos a temperatura ambiente, em seguida, foi realizada a análise das células tratadas e não tratadas (controle negativo) através de citometria de fluxo, os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.11 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos experimentos de citotoxicidade foram realizadas em programa GraphPad Prism 7 seguindo do pós-teste Dunnet. Os resultados expressos com média \pm SD, valores com $p < 0.05$ considerado estatisticamente significante.

3 Resultados

3.1. Extração e Purificação da Lectina EgviL

Para a purificação da EgviL usou-se o precipitado da fração 0-20%, por apresentar concentração proteica de 10,3 mg/mL e a melhor AH específica de 12,43. O precipitado da fração foi submetido a cromatografia em gel filtração (Figura 1), apresentando dois picos

proteicos (PI e PII). Observado que apenas o pico II apresentou AH específica de 72,31 maior que o precipitado, e apresentando fator de purificação de 9,31 (Tabela 1).

Tabela 1. Purificação da lectina EgviL dos capítulos florais de *Egletes viscosa*.

Amostra	Proteína mg/mL	Atividade Hemaglutinante (AH)		
		Unidades	AHE	Fator de Purificação
Extrato	8,24	64	7,76	1,0
PF 0-20%	10,3	128	12,43	1,60
SF 0-20%	5,65	8	1,43	0,18
EgviL	1,77	128	72,31	9,31

PF (precipitado da fração), SF (sobrenadante da fração), AHE (atividade hemaglutinante específica) é correspondente entre o valor de unidades pela concentração proteica (mg/mL). O valor do fator de purificação é calculado pela razão entre AHE de todas as amostras e a AHE do extrato.

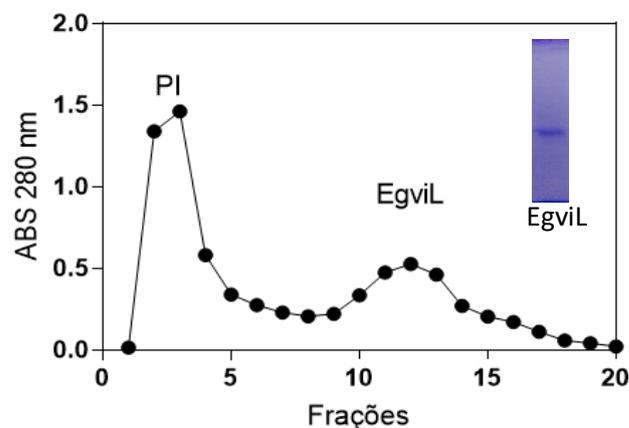


Figura 1. Purificação da lectina dos capítulos florais de *Egletes viscosa* por cromatografia de exclusão molecular, usando NaCl 0,15 M, foram aplicados 1,0 mL do precipitado da fração 0-20%, a leitura do coletado foi realizada em 280nm.

3.2. Ensaios de Caracterização por Métodos Físico-Químicos

A eletroforese SDS-PAGE (Figura 1A) revelou uma única banda polipeptídica com massa molecular de 28,8 kDa e uma única mancha na focalização isoeletrica com pI (ponto

isoeletrico) de 5,4 (Figura 1B), sendo assim o pico II foi nomeado de EgviL, de acordo com essas análises pode-se sugerir que possivelmente a EgviL é uma proteína monomérica. Dando prosseguimento a caracterização, foi realizado o ensaio de inibição da AH da proteína por carboidrato e glicoproteínas, sendo observado inibição parcial para os açúcares glicose (8 UAH) e galactose (4 UAH), visto que os demais açúcares: manose, frutose, lactose, sacarose, fucose, N-acetil-glicosamina, arabinose, maltose e glicoproteínas: albumina e fetuína não afetaram a AH (128 UAH).

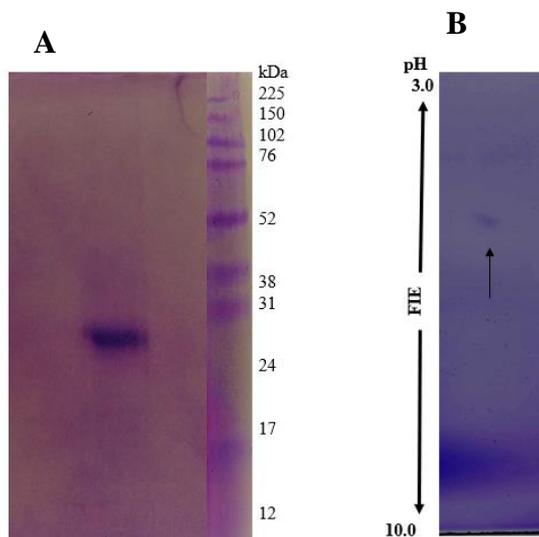


Figura 2. (A) Separação molecular da EgviL por eletroforese desnaturante SDS-PAGE, apresentando apenas uma banda polipeptídica e os marcadores moleculares padrão. (B) Eletroforese bidimensional (focalização isoeletrica) mostrando apenas um ponto (EgviL).

A estabilidade da EgviL a diferentes temperaturas (0-100 °C) (Figura 2A) e valores de pH (3-12) (Figura 2B), mostram que a lectina se mantém estável em temperaturas de 30-60°C (128 UAH) e apresentando decaimento quando exposta as temperaturas 70-100°C (16 UAH). Quando exposta aos pH de 3-4 a proteína se manteve estável (128 UAH), em pH 5-7 apresentou uma melhora em seu potencial hemaglutinante de 256 UAH, nos pH 8-12 é possível observar uma redução e inativação da lectina em meio alcalino. Em relação a exposição a íons a molécula

não apresentou estimulação e nem inativação de sua AH na presença dos íons CaCl_2 , MgCl_2 e KCl .

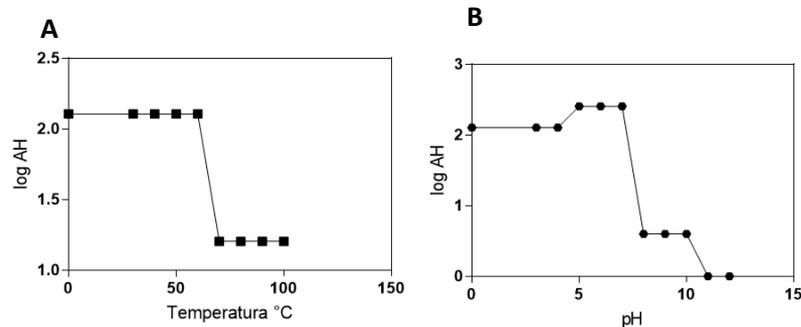


Figura 3. (A) Alteração da estabilidade da EgviL após ser exposta ao aquecimento de 30-100°C (B) Exposição a diferentes pH, mostra que a atividade hemaglutinante da EgviL diminui em pH alcalino.

3.3 Avaliação de Parâmetros Termodinâmicos, para a elucidação da Interação da EgviL aos Carboidratos Galactose e Glicose por quenching de Fluorescência.

Depois de descobrirmos que a lectina é inibida parcialmente por galactose e glicose, surgiu as seguintes perguntas: Como acontece essa interação? Qual o tipo de interação ocorre entre essa proteína e esses açúcares e que tipo de ligação está envolvida? Para encontrarmos as respostas resolvemos investigar através dos parâmetros termodinâmicos de interação, então, expusemos a lectina a uma titulação com os glicídios, em temperaturas de 303 K, 308 K e 313 K em espectrofluorímetro como descrito na seção 2.6.

Após a obtenção dos resultados, foram observadas alterações no espectro da intensidade de fluorescência da EgviL ocasionado pela titulação das moléculas de açúcares, alterações da quenching de fluorescência (Figura 4A-B). Após isso, foi aplicado o tratamento matemático de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência equação (1). Sendo observado um perfil linear do gráfico da função F_0/F seguido de regressão linear, demonstrando constantes de supressão

(K_{sv}) para EgviL-galactose e EgviL-glicose (Figura 4 C-D), a partir dos resultados obtidos, observou-se um aumento nos valores de K_{sv} à medida que ocorreu a elevação da temperatura (Tabela 2), demonstrando mecanismo de interação dinâmico entre a proteína e os glicídios.

A constante de associação ou ligação (K_a) foi obtida através do ajuste da equação (2). Os resultados apresentaram um perfil linear para cada temperatura testada (Figura 4E-C), notando-se que o K_a para ambos açúcares foi de $K_a \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$, indicando uma ligação de força moderada entre a lectina e os glicídios. Foi observado que o K_a para galactose diminuiu e para a glicose aumentou em função da temperatura (Tabela 2).

Os parâmetros termodinâmicos foram determinados pela equação (3), para analisar a espontaneidade da ligação utilizou-se a equação (4). A partir das análises os resultados mostram que a ligação entre EgviL e galactose é espontânea de caráter eletrostático apresentando $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ e $\Delta G < 0$, e a ligação entre EgviL e a glicose é espontânea constituída por forças hidrofóbicas, com valores $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ e $\Delta G < 0$ (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos da interação EgviL-galactose/glicose

	T(K)	$K_{sv}(\times 10^3 \text{M}^{-1})$	n	$K_a (\times 10^3 \text{M}^{-1})$	$\Delta H \text{ J.mol}^{-1}$	$\Delta S \text{ J. K}^{-1} \text{ .mol}^{-1}$	ΔG
Galactose	303.15	0,253±0.036	1	0,2958±0,01028	-11.589,7 ± 2,0	9,1±5,5	-14,3
	308.15	0,260±0.036	1	0,2796±0,1027			-14,3
	313.15	0,305±0.030	1	0,2553±0,01072			-14,4
Glicose	303.15	0,180±0.054	1	0,2023±0,01065	28.201,0±13,0	137,0±41,0	-13,3
	308.15	0,193±0.012	1	0,2113±0,01101			-14,0
	313.15	0,261±0.010	1	0,2897±0,01073			-14,7

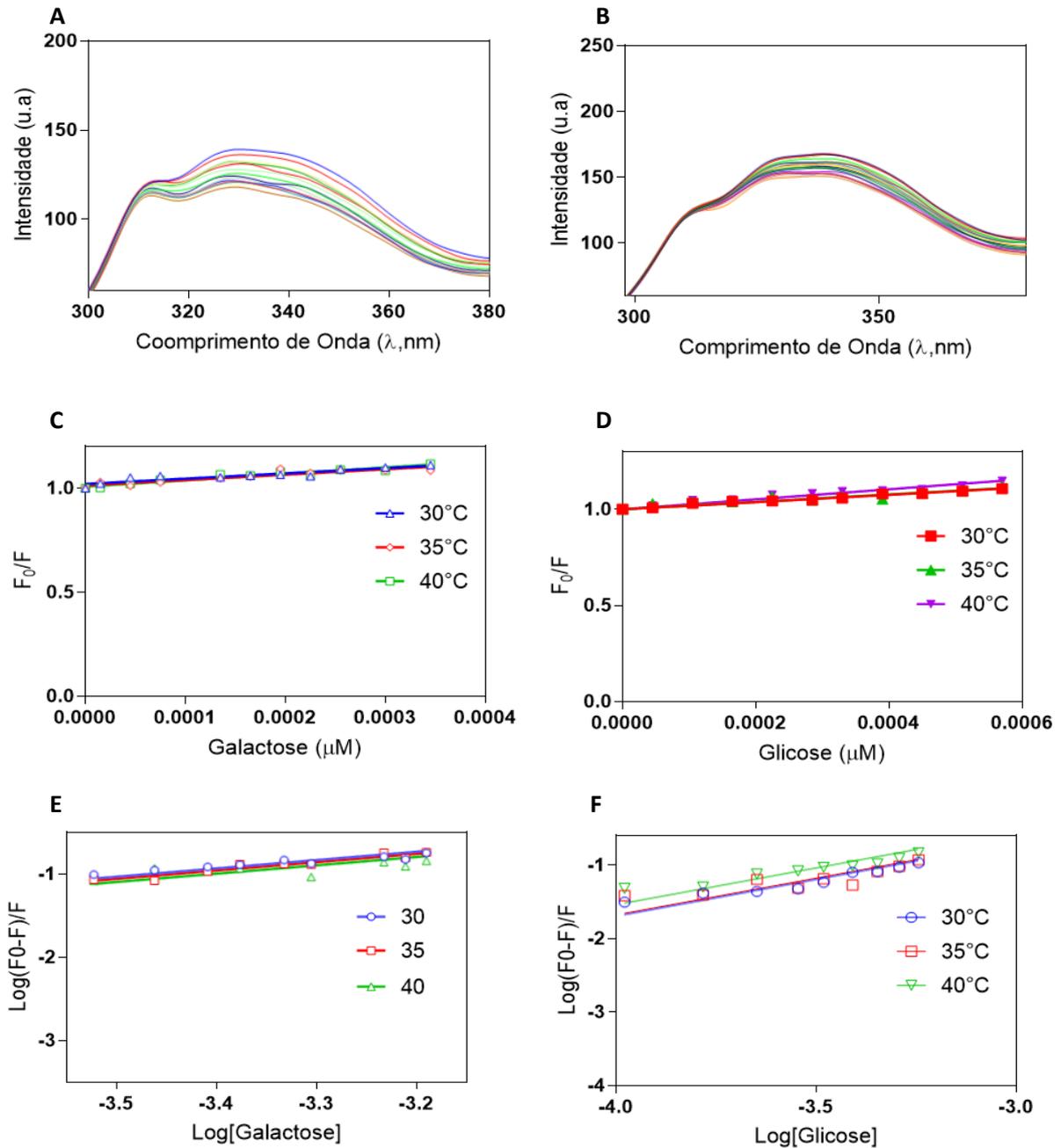


Figura 4. (A) Intensidade de fluorescente da titulação da lectina com a galactose. (B) Intensidade de fluorescente da titulação da lectina com a glicose. (C) Gráfico de Stern-Volmer da interação EgviL-galactose, em diferentes temperaturas. (D) Gráfico de Stern-V da interação EgviL-glicose, em diferentes temperaturas. (E) Gráfico da constante de associação (K_a) lectina-galactose em diferentes temperaturas. (F) Gráfico da constante de associação (K_a) lectina-glicose em diferentes temperaturas.

3.4. Investigação do Sítio de Ligação da EgviL aos Carboidratos por Meio de ^1H RNM.

Os ensaios de ^1H RMN foram realizados de galactose em solução contendo a EgviL, os espectros obtidos estão presentes na (Figura 5A). Os resultados apresentaram alterações químicas significativas nos H1 com deslocamento químico de ($d = 0,00194$ ppm) e H6 ($d = 0,002634$ ppm) durante a titulação da lectina (Figura 5B-C), dados que nos permitiu sugerir que o sítio de ligação da proteína ao glicídio galactose pode ocorrer por meio da interação com os hidrogênios 1 e 6 presentes na cadeia desse carboidrato.

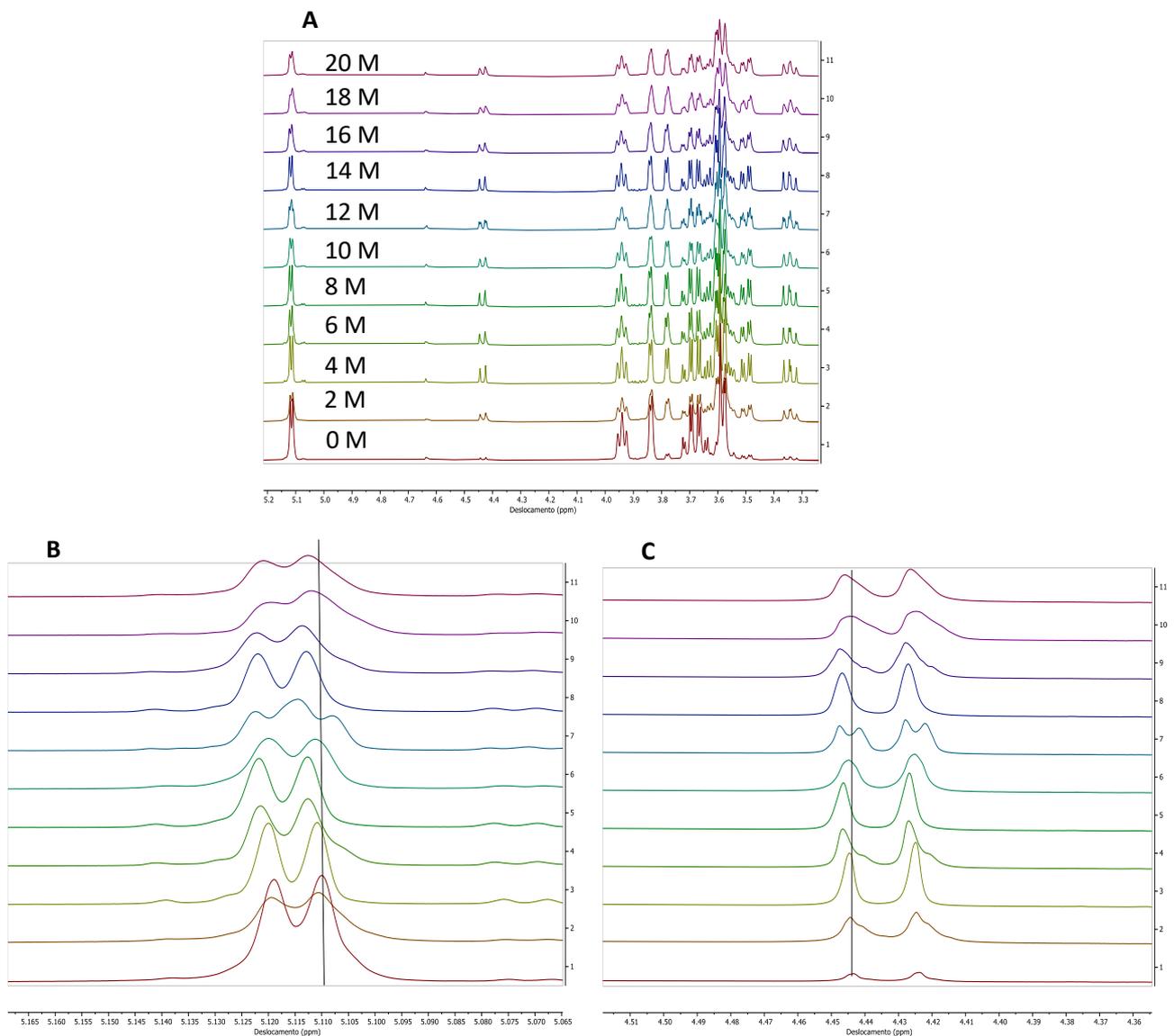


Figura 5. (A) Titulação da EgviL. (B) Alteração estrutural do H 1 da galactose na presença da EgviL 0-20 M em temperatura de 298 K. (C) Alteração estrutural do H 6 da galactose na presença da EgviL 0-20 M em temperatura de 298 K.

3.4. Análise de Alteração Conformacional da EgviL na Presença dos Glicídios Galactose e Glicose Através de UV-Vis.

De acordo com os resultados obtidos dos espectros de absorção de UV-Vis da lectina com os carboidratos, não foram observadas alterações do microambiente da proteína quando titulada com as soluções contendo carboidratos (Figura A-B).

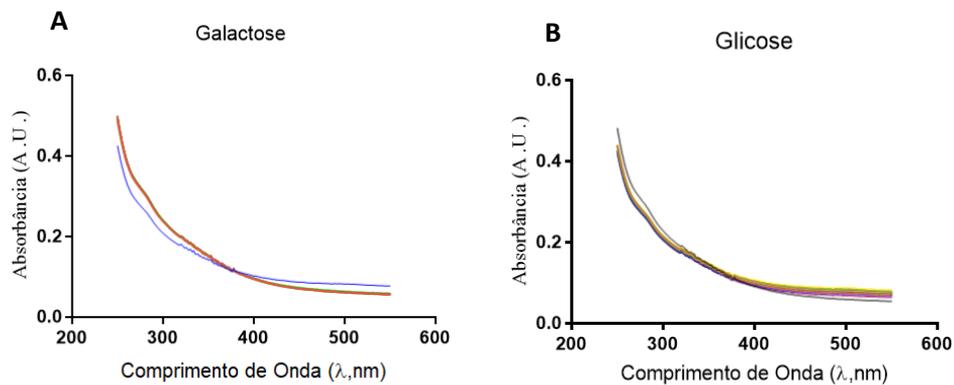


Figura 6. (A-B) Absorção dos carboidratos galactose e glicose durante a titulação da EgviL por UV-Vis.

3.5 Ensaio de Viabilidade por MTT

Nesse ensaio foi observado que a EgviL apresentou toxicidade significativa nas células testadas (Figura 7), visto que para as células mononucleares de sangue humano (PBMC) a proteína também apresentou toxicidade (Figura 7A), porém somente na maior concentração testada (100 µg/mL). A partir desses resultados obtivemos a concentração que inibe o crescimento celular em 50% (IC₅₀) (Tabela 3). Notou-se que a lectina demonstrou maior toxicidade para as células de linhagem leucêmicas (Figura 7D e F), sendo duas vezes mais seletiva para essas linhagens celulares relação as células normais (Tabela 3).

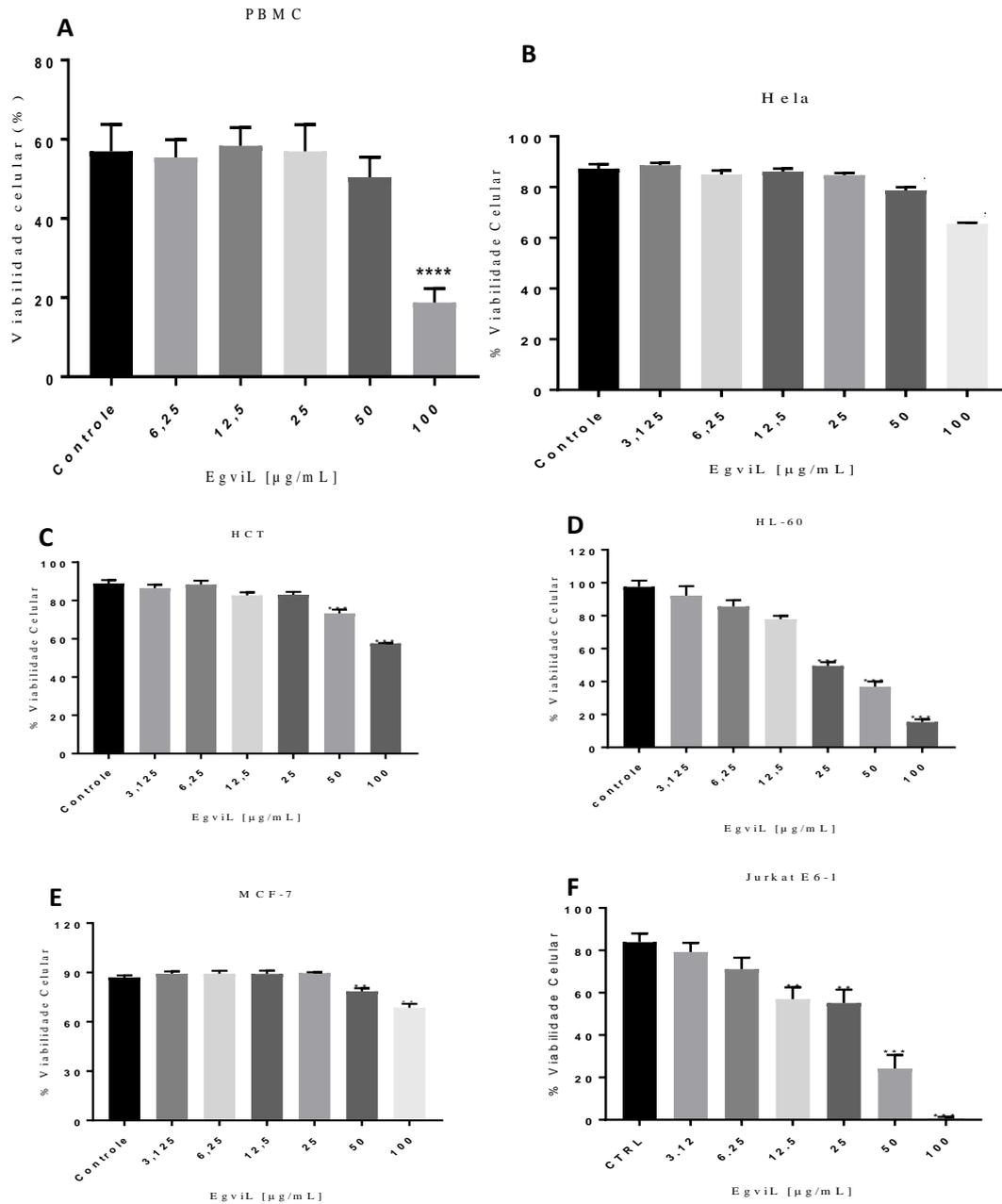


Figura 7. Ensaio de citotoxicidade expostas a diferentes concentrações da EgviL (3,125-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) após 24 horas. (A) Viabilidade celular das células mononucleares humanas (PBMC). (B-F) Viabilidade celular em linhagens neoplásicas. Ensaio realizado em triplicata.

Tabela 3. Os dados se referem a concentração que inibe o crescimento de 50% (IC₅₀) das células e o índice de seletividade, dados obtidos através dos ensaios de citotoxicidade por MTT.

	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
PBMC	58,9	
HL-60	22,0	2,67
JURKAT	24,1	2,44

3.5.2 Investigação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo

Após a obtenção dos resultados de viabilidade celular e índice seletivo (IS), foram escolhidas as células HL-60 e Jurkat E6-1, para a investigação do mecanismo de morte celular induzida por EgviL. Vale ressaltar que para as HL-60 foram testadas a IC₅₀ e 2xIC₅₀, mas para a Jurkat se testaram a IC₅₀, a metade da IC₅₀ e 2xIC₅₀, pois como foi visto na viabilidade celular para essa célula (Figura 7F), a proteína apresentou morte significativa para a concentração de 12 µg/mL, valor aproximado a metade da IC₅₀, devido a esse resultado resolvemos realizar os ensaios para as três concentrações.

É observado que a EgviL causou apoptose (Ann+/IP-), para ambas as células tanto em 24 horas quanto em 48 horas para todas as concentrações testadas (Figura 8A-D). Nota-se que nos ensaios de 48 horas a proteína ocasionou apoptose ou necrose tardia (Annv+/IP+) em células de linhagem promielocítica (HL-60) (Figura 8C). Para as células da linhagem Jurkat, notou-se que o polipeptídeo demonstrou um aumento do porcentual de morte por apoptose no período de 48 quando comparado ao período de 24 horas.

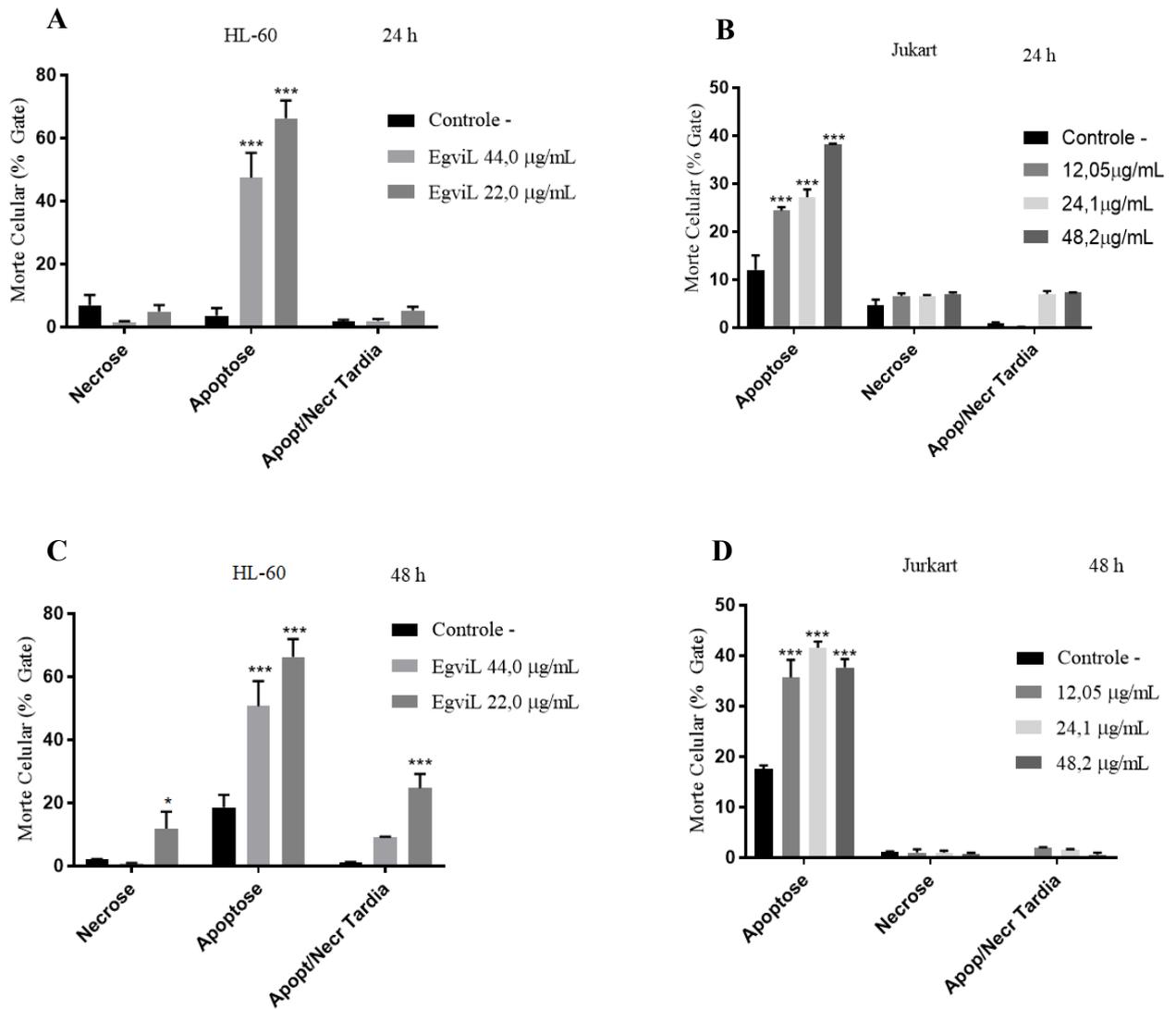


Figura 6. Representação gráfica da avaliação de morte celular (apoptose e necrose) causada por EgviL após 24 e 48 horas. (A e C) Avaliação de apoptose causada em linhagem neoplásica HL-60 tratadas com concentrações de 22 e 44 µg/mL. (B e D) Avaliação de apoptose causada em linhagem neoplásica Jurkat E6-1 tratadas com concentrações de 12,05, 24,1 e 48,2 µg/mL

3.5.3 Análise de Alteração do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Dando seguimento a investigação de mecanismos de morte celular induzidos por EgviL, analisamos alterações do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo, através da incorporação do fluorocromo Rodamina 123 após os tratamentos de 24 e 48 horas. As células (HL-60 e Jurkat E6-1), foram tratadas com as mesmas concentrações utilizadas para os ensaios de Apoptose e necrose. Os resultados obtidos mostram que a lectina não apresentou

nenhuma alteração sobre o potencial transmembrânico mitocondrial das células testadas (Figura 8A-D).

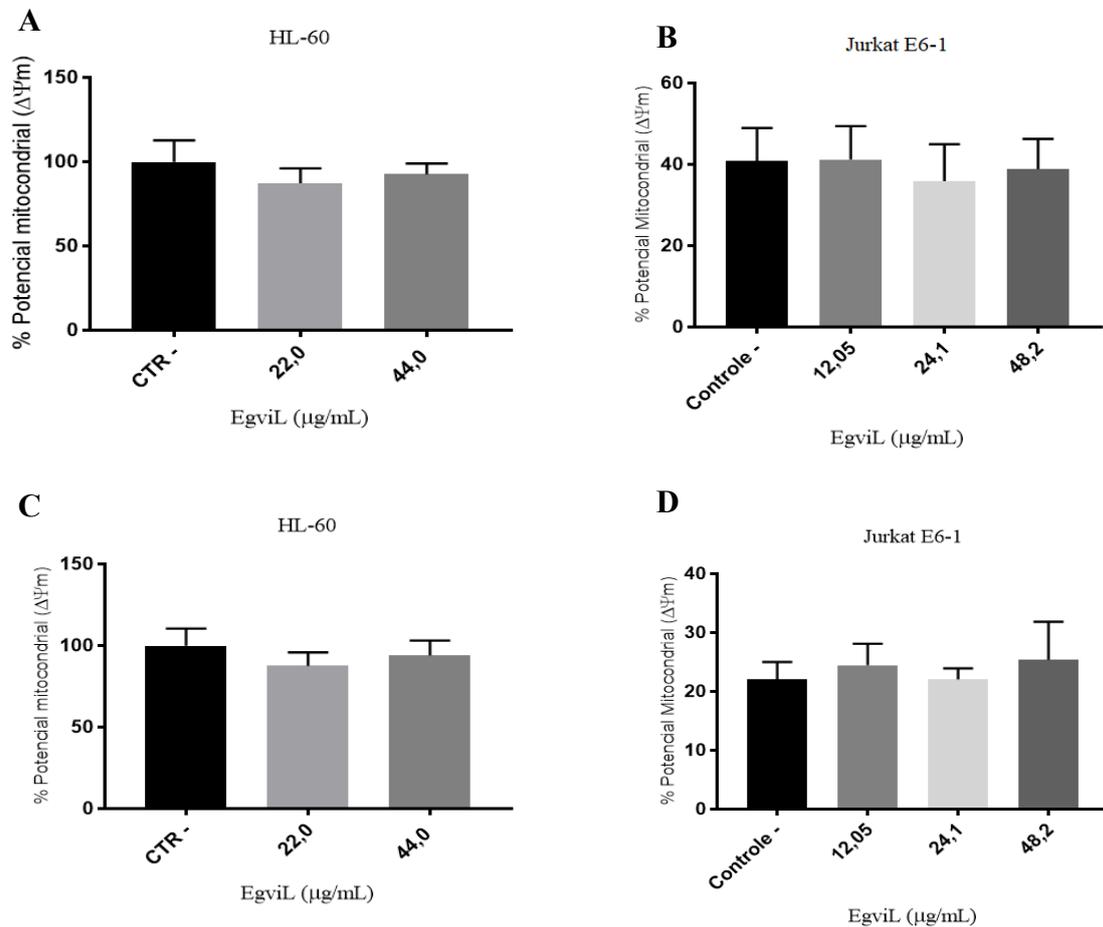


Figura 9. Avaliação da capacidade da EgviL causar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial após 24 e 48 horas. (A e C) Células de linhagem HL-60 tratadas e não tratadas após 24 e 48 horas. (B e D) Células de linhagem Jurkat E6-1 tratadas e não tratadas após 24 e 48 horas.

3. Discussão

Egletes viscosa é uma planta popularmente muito utilizada por apresentar propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória, bactericida, mio-relaxante e digestiva

(CARVALHO et al., 2019). A presente pesquisa relata o isolamento de uma lectina dos capítulos florais de *E. viscosa* com ação citotóxica sobre células leucêmicas, visando ampliar seu potencial biotecnológica.

A EgviL é uma proteína (28,8 kDa) de caráter ácido (pI=5,4), que apresentou decaimento em sua capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho, após ser incubada na presença de pH alcalino (8-12), sua melhor AH aconteceu em pH 5,0-7,0. Atividade não dependente de íons, resultados semelhantes aos apresentados pela lectina com ponto isoelétrico de 5,4, BfL (*Bauhinia forficata*) [17], com maior AH em pH 6,0, assim, como a DdeL (lectina de *Dypsis decaryi*) que apresenta melhor atividade aglutinante de eritrócitos de coelhos em pH 5-6 [18].

De acordos com os resultados de inibição a carboidratos, a EgviL tem afinidade pelos glicídios: glicose e galactose. Comportamento semelhante a lectina isolada de feijão do campo (*Dolichos lablab*), que apresenta afinidade por mais de um açúcar [19], a lectina de *Machaerium acutifolium* também apresenta característica de especificidade a mais de um glicídio. A EgviL se manteve estável até a temperatura de 60°C, sendo uma proteína resistente ao aquecimento, característica comum a muitas lectinas, como exemplo as lectinas extraídas do farelo de arroz (*Oryza sativa*) RBA1, RBA2 que permaneceram estáveis até a temperatura de 80°C [20]. A MAL (*Machaerium acutifolium*), é outra lectina que se mantém estável quando exposta a temperaturas de até 50°C [21], de acordo com Procópio et al. (2017) a lectina isolada de *Calliandra surinamensis* (CasuL) é uma proteína ácida termoestável, sem alteração de sua AH quando aquecida à 100°C [10].

Os parâmetros termodinâmicos determinam que a EgviL é uma proteína com sistema quenching de natureza dinâmica, com um K_a moderado, ligação do tipo espontânea de caráter eletrostático para a galactose e de forças hidrofóbicas para glicose. Quenching dinâmico é um fenômeno de colisão, ou seja, quando se há uma elevação de temperatura

existe a indução de colisão entre a molécula proteica e os açúcares excitados, por conseguinte, o aumento do K_{sv} (Constante de supressão ou Constante de Stern-Volmer). Assim, a partir da obtenção dos valores da constante de supressão é possível definir constante de associação e tipos de ligação entre molécula e supressor [22].

A utilização de supressão da intensidade de fluorescência, vem sendo utilizada para a análise das características de ligação entre lectina e carboidratos, como exemplo temos a lectina de *Litchi chinensis* que apresentou afinidade por dois açúcares distintos, interação termodinâmica do tipo K_{sv} estático, quando ocorre diminuição da constante de supressão em aumento da temperatura, apresentando ligação espontânea por pontes de hidrogênio ou Van der Waals para ambos carboidratos [23]. Outro exemplo é a lectina ligante a dois açúcares extraída de *Anona comosus* que apresenta ligação espontânea por pontes de hidrogênio ou Van der Waals para ambos glicídios [24], a diferença entre os resultados pode ocorrer por características distintas para cada lectina, pois cada uma tem sua particularidade quanto composição estrutural.

A EgviL não altera sua estrutura conformacional para se ligar aos carboidratos, a ligação EgviL-galactose ocorre por interação com hidrogênios presente na cadeia carbônica desse monossacarídeo, visto que existe variação no deslocamento químico dos hidrogênios 1 e 6 da galactose na presença dessa lectina. A proteína laminina é um exemplo de afinidade proteína-carboidrato por variação do deslocamento químico do 1H presente na cadeia de glicídios [25], resultados semelhantes aos da presente pesquisa. Em estudos realizados por Menezes et al., (2018) demonstraram que a proteína tirosinase interage aos compostos aspiro-acridinas por meio de mudanças dos H8 e H17 [26]. Outros estudos mostraram alterações do espectro do 1H da cadeia do glicídio arabinose na presença das proteínas AbnB-D17A e AbnB-E201A [27].

A interação de lectinas com receptores de morte celular pode desencadear a modulação positiva ou negativa do mecanismo apoptótico, podendo afetar a sinalização e associação de receptores [33]. A proteína EgviL causou a morte das células leucêmicas por indução apoptótica, resultados semelhantes aos da lectina purificada de *Artocarpus lingnanensis* que também induziu morte celular por apoptose em linhagem celular de linfoma B humano [34]. As proteínas do grão de bico (*Cicer arietinum*-CAL) e da *Glutinous beut* são outros exemplos de lectinas indutoras de morte celular por via apoptótica em células neoplásicas [35, 36].

Conclusão

Diante aos resultados obtidos, relatamos o isolamento da lectina dos capítulos florais de *E. viscosa*. Proteína ácida com peso molecular de 28,8 kDa, resistente a temperaturas de até 60°C, com afinidade para galactose e glicose através de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas, possuindo potencial citotóxico por meio de mecanismo apoptótico frente células leucêmicas (HL-60 e Jurkat E-1), demonstrando um potencial biotecnológico promissor.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 446902 / 2014-4) pelas bolsas, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; AUXPE 1454/2013) e a Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08 / 14; APQ-0661-2.08 / 15) para apoio financeiro. A DCG gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

- [1] F. Iordache, I. Carmen, P. Aneta, M. Lupu, E. Andrei, C. Buzila, H. Maniu. Effects of plant lectin and extracts on adhesion molecules of endothelial progenitors. *Open Life Sciences*, 6 (2011) 330-341.
- [2] W. J. Peumans, E. J. M. Van Damme. Plant lectins: versatile proteins with importante perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Geneteic Engineering Rewiews*, 15 (1998) 199 - 228.
- [3] A. KARNCHANATAT. Antimicrobial Activity of Lectins from Plants. In: Bobbarala, V. *Antimicrobial Agents*, (2012) 145-178.
- [4] J. E. C. FREIRE, I. M. VASCONCELOS, F. B. M. B. Moreno, A. B. Batista, M. D. P. Lobo, M. L. Pereira, R. V. M. Almeida, A. J. S. Sousa, A. C. O. Monteiro-Moreira, J. T. A. Oliveira, T. B. Granjeiro. Mo-CBP3, an Antifungal Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds, Is a Member of the 2S Albumin Family. *PLoS ONE*. 10 (2015). e0119871.
- [5] R.R.S. Silva, C.R. Silva, V.F. Santos, C.R.S. Barbosa, D.F. Muniz, A.L.E. Santos, M.H. C. Santos, B.A.M. Rocha, K.L.R. Batista, L.M. Costa-Júnior, H.D.M. Coutinho, C.S. Teixeira, *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*, *Microb. Pathog.* 135 (2019) 103629.
- [6] . S. Nunes, M. A. Souza, A. F. Vaz, T. G. Silva, J. S. Aguiar, A. M. Batista, M. M. Guerra, M. C. Guarnieri, L. C. B. B. Coelho, M. T. S. Correia. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon*, 59 (2012) 667-671.

- [7] M. C. Coriolano, J. de Santana Brito, de Siqueira, L. S. Patriota, A. K. de Araujo, V. M. B. de Virgínia, P. M. G. Paiva, L. C. B. B. Coelho, C. M. de Melo. Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Protein and peptide letters*. 25(2018), 295-301.
- [8] I. S. Nascimento, M. Q. Santiago. V. R. Pinto-Junior. V. J S. Osterne, F. W. V. Martins, A. P. M. Nascimento, I. A. V. Wolin, I. A. Heinrich, M. G. Q. Martins, M. T. L. Silva, C. F. Lossio, C. R. C. Rocha, R. B. Leal, B. S. Cavada. Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. *The international journal of biochemistry & cell biology*, (2017) 92 79-89.
- [9] J. Lubkowski, S. V. Durbin, M. C. Silva, D. Farnsworth, J. C. Gildersleeve, M. L. V. Oliva, A. Wlodawer. Structural analysis and unique molecular recognition properties of a *Bauhinia forficata* lectin that inhibits cancer cell growth. *The FEBS journal*, 284 (2017), 429-450.
- [10] T. F. Procópio, L. L. S. Patriota, M. C. Moura, P. M. da Silva, A. P. S. Oliveira, L. V. N. Carvalho, T. A. Lima, T. Soares, T. D. da Silva, L. C. B. B. Coelho, M. G. R. Pitta, M. J. B. M. Rego, P. M. G. Paiva, T. H. Napoleão. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *International journal of biological Macromolecules*. 98 (2017) 419-429.
- [11] F. J. A. Matos. Medicinal plants—Guide for selection and use of plants used in herbal medicine in northeastern Brazil. Impr. Universitaria/Issues UFC, Fortaleza. 344 (2002).
- [12] M.M. Guedes, A.N. Cunha, E.R. Silveira, V.S.N. Rao. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa* *Planta Med.* 68 (2002) 1044-1378.

- [13] P. E. A. de Aquino, N. L. F. Pereira, F. G. Figueiredo, S. S. Ferreira, L. M. G. Leandro, J. C. C. O. Souza, C. D. M. Oliveira, J. K. L. Santana, C. M. G. Torres, M. R. Silva, H. D. M. Coutinho, E. F. F. Matias. The association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by extracts of dry floral buttons of *Egletes viscosa* L.(macela). *European Journal of Integrative Medicine*. 7 (2015) 258-262.
- [14] V. C. V. Batista, I. M. C. Pereira, S. O. Paula-Marinho, K. M. Canuto, R. C. A. Pereira, T. H. S. Rodrigues, D. M. Daloso, E. Gomes-Filho, H. H. de Carvalho. Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant *Egletes viscosa*. *Environmental and Experimental Botany*. 167 (2019) 103870.
- [15] U. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 277 (1970) 680–685.
- [16] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1951) 265-75.
- [17] M. C. C. Silva, L. A. Santana, R. Mentele, R. S. Ferreira, A. de Miranda, R. A. Silva-Lucca, M. U. Sampaio, M. T. S. Correia. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process biochemistry*, 47 (2012) 1049-1059.
- [18] M. E. L. M. Torres, R. M. P. Brandão-Costa, J. V. O. dos Santos, I. M. F. Cavalcanti, M. M. da Silva, T. P. Nascimento, C. O. Nascimento, A. L. F. Porto. DdeL, a novel thermostable lectin from *Dypsis decaryi* seeds: Biological properties. *Process Biochemistry*, 86 (2019) 169-176.

- [19] D. H. Rao, L. R Gowda. The d-galactose specific lectin of field bean (*Dolichos lablab*) seed binds sugars with extreme negative cooperativity and half-of-the-sites binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 524 (2012) 85–92.
- [20] H. Nakata, C. Y. Lin, M. Abolhassani, T. Ogawa, H. Tateno, J. Hirabayashi. K. Muramoto. Isolation of rice bran lectins and characterization of their unique behavior in caco-2 cells. *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 1052.
- [21] A. L. E. Santos, G. O. Leite, R. F. Carneiro, C. S. Nagano, A. H. Sampaio, B. A. M. Rocha, P. Delatorre, A. R. Campos, C. S. Teixeira.). Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. . *Archives of biochemistry and biophysics*, 664 (2019), 149-156.
- [22] J. R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media. (2013).
- [23] P. P. Bose, S. Bhattacharjee, S. Singha, S. Mandal, G. Mondal, P. Gupta, B. P. Chatterjee. A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. *Biochemistry and biophysics reports*, 6(2016) 242-252.
- [24] M. Azkarkan. G. Feller, J. Vandenameele, R. Herman, R. E. Mahayaoui, E. Sauvage, A. V. Broeck, A. Matagne, P. Charlier, F. Kerff. Biochemical and structural characterization of a mannose binding jacalin-related lectin with two-sugar binding sites from pineapple (*Ananas comosus*) stem. *Scientific reports*, 8 (2018) 1-14.
- [25] D. C. Briggs, T. Yoshida-Moriguchi, T. Zheng, D. Venzke, M. E. Anderson, A. Strazzulli, A. Strazzulli, M. Moracci, L. Yu, E. Hohenester, Campbell, K. P. Structural

- basis of laminin binding to the LARGE glycans on dystroglycan. *Nature Chemical Biology*, 12 (2016) 810–814.
- [26] T. M. Menezes, S. M. V. de Almeida, R. O. de Moura, G. Seabra, M. D. C. A. de Lima, J. L. Neves, Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. *International journal of biological macromolecules*, 122 (2019) 289-297.
- [27] M. Rozenberg, S. Lansky, Y. Shoham, Y. G. Shoham, Spectroscopic FTIR and NMR study of the interactions of sugars with proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 222 (2019) 116861.
- [28] GRAWE, Klaus. *Neuropsychotherapy: How the neurosciences inform effective psychotherapy*. Routledge, (2017).
- [29] J. S. Beckman, S. Joseph, W. W. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271 (1996) C1424-C1437.
- [30] G. H. OLIVEIRA-PAULA, R. Lacchini, J. E. Tanus-Santos, E. Jose. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide*, 63 (2017) 39-51.
- [31] L. L. S. Patriota, T. F. Procópio, J. S. Brito, V. Sebag, A. P. S. de Oliveira, A. K. A. Soares, L. R. Moreira, T. A. Lima, T. Soares, T. D. da Silva, P. M. G. Paiva, T. H. Napoleão. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. *International journal of biological macromolecules*, 103 (2017) 36-46.

- [32] Q. Zeng, F. Lin, L. Zeng, Y. Deng, L. Li. Purification and characterization of a novel immunomodulatory lectin from *Artocarpus hypargyreus* Hance. *International immunopharmacology*, 71 (2019) 285-294.
- [33] R. G. Lichtenstein, G. A. Rabinovich, *Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. Cell Death & Differentiation*, 20 (2013) 976-986.
- [34] Y. Luo, X. Liu, F. Lin, L. Liao, Y. Deng, L. Zeng, Q. Zeng, Cloning of a novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* that induces apoptosis in human B-lymphoma cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 82 (2018) 258-267.
- [35] N. Gupta, P. S. Bisen, S. S. Bhagyawant, Chickpea lectin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis through cell cycle arrest. *Protein and peptide letters*, 25 (2018) 492-499.
- [36] T. Ponraj, M. Paulpandi, R. Vivek, K. Vimala, S. Kannan, Protein regulation and Apoptotic induction in human breast carcinoma cells (MCF-7) through lectin from *G. beatus*. *International journal of biological macromolecules*, 95 (2016) 1235-1245.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo relata o isolamento da lectina dos capítulos florais de *E. viscosa* (EgviL). Proteína ácida com peso molecular de 28,8 kDa, resistente a aquecimento de até 60°C, possui afinidade por galactose e glicose através de ligações espontâneas eletrostáticas e hidrofóbicas, possuindo efeitos citotóxico por meio de mecanismo apoptótico frente células leucêmicas (HL-60 e Jurkat E-1), demonstrando um potencial biotecnológico promissor, porém, fazendo-se necessário a realização de mais estudos sobre seus mecanismos bioativos.

REFERENCIAS

- A. K. M., KHATUN, H., KABIR, S. R. Geodorum densiflorum rhizome lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of BAX, p53 and NF- κ B genes expression. *International journal of biological macromolecules*, 125, 92-98, 2019.
- ALBUQUERQUE, L. P. de; SÁ SANTANA, G. M.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. V.; PAIVA, P. M. G. Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1098–1105, 2014.
- ARAÚJO, A. A. S., BONJARDIM, L. R., MOTA, É. M., ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C., ESTEVAM, C. D. S., CORDEIRO, L., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes viscosa* Less (Asteraceae). **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 4, p. 707-715, 2008.
- BASU, S., GHOSH, S., GANGULY, N. K., MAJUMDAR, S. A biologically active lectin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 657-666, 2004.
- I BUDIHardjo, H OLIVER, M LUTTER, X LUO, X WANG. **Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. v.15, pp. 269-290, 1999.
- BRAGA, A. A., E LACERDA, R. R., DE VASCONCELOS MEDEIROS, G. K. V., GONÇALVES, G. F., PESSOA, H. D. L. F., CARDOSO, J. D., GADELHA. C. A. A., DA SILVA, B. A., SANTI-GADELHA, T. Antibacterial and hemolytic activity of a new lectin purified from the seeds of *Sterculia foetida* L. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 175, n. 3, p. 1689-1699, 2015.
- CAMPOS, J. K., ARAÚJO, C. S., ARAÚJO, T. F., SANTOS, A. F., TEIXEIRA, J. A., LIMA, V. L., & COELHO, L. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. *Biochimie open*, v. 1, n. 2, p. 62-68, 2016.
- COELHO, L.C.B.B., SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem.Anal.**, v. 11, p. 1–6, 2000.
- COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. Protein Purification by Affinity Chromatography. In: **Protein Purification**. InTech, p. 53–72, 2012.
- COSTA. R. B., CAMPANA. P.T., CHAMBERGO. F. S., NAPOLEÃO. T. H., PAIVA. P. M. G., PEREIRA. H. J. V., OLIVA. M. L. V., GOMES. F. S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules** V.119, n. 1, p. 517-523, 2018.
- CORIOLOANO, M. C., DE SANTANA BRITO, J., DE SIQUEIRA, P., LEYDIANNE, L., DE ARAUJO, S., ANA, K., DE LORENA, M. B., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H., DE MELO, C. M. (2018). Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Protein and peptide letters*, 25(3), 295-301.

CRUZ, D. R. R. Isolamento, **Purificação E Caracterização Parcial Da Lectina De Folhas De Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel, Nativa Do Bioma Caatinga**. Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2015. Dissertação.2015.

DAMICO, C.D. **Purificação, propriedades físico-químicas e estudo das atividades inseticida, fungicida e citotóxica de uma lectina presente em sementes de Koelreuteria paniculata**. 2002. 129f. dissertação (mestrado em biologia funcional e molecular) - instituto de biologia, universidade estadual de campinas, são paulo 2002.

DE AQUINO, Pedro Everson Alexandre et al. The association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by extracts of dry floral buttons of *Egletes viscosa* L.(macela). **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 258-262, 2015.

DELATORRE, P., ROCHA, B. A., GADELHA, C. A., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., SOUZA, E. P. SOUZA., K. S. NASCIMENTO., V. N. FREIRE., A. H. SAMPAIO., W. F. AZEVEDO JR., B. S. CAVADA. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of structural biology**, v.154, n. 3, p. 280-286, 2006.

DE OLIVEIRA FIGUEIRÔA, E., ARANDA-SOUZA, M. Â., VAREJÃO, N., ROSSATO, F. A., COSTA, R. A. P., FIGUEIRA, T. R., DA SILVA, L. C. N., CASTILHO, R. F., VERCESI, A. E., DOS SANTOS CORREIA, M. T. pCramoll and rCramoll lectins induce cell death in human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells by impairment of mitochondrial homeostasis. **Toxicology in Vitro**. V. 43, p. 40-46, 2017.

DO NASCIMENTO-NETO, L. G., CABRAL, M. G., CARNEIRO, R. F., SILVA, Z., ARRUDA, F. V., NAGANO, C. S., FERNANDES, A. R., EDSON, H., VIDEIRA, P. A. Halilectin-3, a lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*, induces apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF7 cells through caspase-9 pathway and LC3-II protein expression. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 18, n. 4, 521-528, 2018.

DE SANTANA BRITO, J., FERREIRA, G. R. S., KLIMCZAK, E., GRYSHUK, L., DE LIMA SANTOS, N. D., DE SIQUEIRA PATRIOTA, L. L., MOREIRA, L. R., SOARES., A. K. A., BARBOZA, B. R., PAIVA, P. M. G., NAVARRO, M. A. F., DE LORENA, V. M. B., MELO, C. M. L., CORIOLANO., M. C., NAPOLEÃO, T. H. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V. 94, p. 865-872, 2017.

DA SILVA, J. D. F., DA SILVA, S. P., DA SILVA, P. M., VIEIRA, A. M., DE ARAÚJO, L. C. C., DE ALBUQUERQUE LIMA, PINHEIRO, I. O. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.

EDINGER, A. L., THOMPSON, Craig B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current opinion in cell biology**. v. 16, n. 6, p. 663-669., 2004

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

GUEDES, M. M.; ARVALHO, S. C.; IMA, F. L.; DE, S. R. Gastroprotective Mechanisms of Centipedic Acid, a Natural Diterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 31, n. 7, p. 1351–1355, 2008.

ISLAM, F., GOPALAN, V., LAM, AKY., KABIR, S.R. Pea lectin inhibits cell growth by inducing apoptosis in the SW480 and SW48 cell lines. **International journal of biological macromolecules**. v. 117, p. 1050-1057, 2018.

KARNCHANATAT, A. Antimicrobial Activity of Lectins from Plants. In: **Bobbarala, V. Antimicrobial Agents**, 2012. 145-178.

KERR, John FR; WYLLIE, Andrew H.; CURRIE, Alastair R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, 1972, 26.4: 239-257.

Kilpatrick, D.C. animal lectins: a historical introduction na orverview, **bhiochimica et biophysica acta-general subjects**. 2002.

KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual review of physiology**, v. 60, n. 1, p. 601-617, 1998.

KROEMER, G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. **Cell Death & Differentiation**. v, 4, n. 6, p. 443-456. 1997.

Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. **Springer Science & Business Media**. 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. Journal of Biological Chemistry, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LORIS R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1572, p. 198–208, 2002.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014–2033, 2015.

MATOS, F. J. de A. O projeto farmácias-vivas e a fitoterapia no nordeste do Brasil. Rev. Cienc. Agrov. v. 5, n. 1, p. 24-32, 2006.

MESQUITA, J. X. **Caracterização estrutural e atividade hipoglicemiante da lectina da alga vermelha *Amansia multifida* C.Lamourox**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 67p, 2010.

MORENO, F. B. M. B. **Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de Lotus Tetragonolobus**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 119 f., 2008.

MORAES, C. S., JUNIOR, F., MASSON, G., REBELLO, K., SANTOS, L., BASTOS, N., FARIA, R. Série em biologia celular e molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas. **Fundação Oswaldo Cruz–Fiocruz**, Rio de Janeiro. 2013.

NASCIMENTO, A. K. C., NOBRE, C., SOARES, M. T., TEIXEIRA, J. A., PORTO, A. L. F. Produção simultânea de-fructofuranosidase e fructo-oligossacarídeos por *Penicillium citreonigrum* URM 4459. 2016.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios De Bioquímica De Lehninger**. Nova York, 1273p, 2011.

NAPOLETANO, F., BARON, O., VANDENABEELE, P., MOLLEREAU, B., & FANTO, M. (2019). Intersections between regulated cell death and autophagy. **Trends in cell biology**. v. 29, n. 4, p. 323-338, 2019.

PETACCI, F.; TAVARES, W. S.; FREITAS, S. S.; TELES, A. M.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. . Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais state, Brazil. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 9–15, 2012.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. **Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants**. In: Antonio Mendez Vilas. (Org.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. : Formatex Research Center. v. 1, p.396-406, 2010.

PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae., **Nova Science Publishers Inc. Nova York**. v. 1, p. 52, 2013.

PATRIOTA, L. L. S.; PROCÓPIO, T. F.; DE SOUZA, M. F. D.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V. N.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–10, 2016.

PROCÓPIO, T. F. **Purificação, caracterização e avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de Calliandra surinamensis Benth. (FABACEAE)**. Exame de Qualificação (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 87p, 2016.

PROCÓPIO, T. F., DE SIQUEIRA PATRIOTA, L. L., DA SILVA BARROS, B. R., DE SOUZA AGUIAR, L. M., DE LORENA, V. M. B., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H. (2018). *Calliandra surinamensis* lectin (CasuL) does not impair the functionality of mice

splenocytes, promoting cell signaling and cytokine production. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 107, p. 650-655, 2018.

RAO, V. S. N., SANTOS, F. A., SOBREIRA, T. T., SOUZA, M. F., MELO, C. L., & SILVEIRA, E. R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta medica**, v. 63, p. 146-149, 1997.

SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKHAILOV, V., DENTON, M., WEINBERG, J. M., & VENKATACHALAM, M. A. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. **The American journal of medicine**. v. 107, n. 5, 489-506., 1999.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. In: **Advances in Medicine and Biology**. Nova Science Publishers, Inc., 63p. 34–60, 2013.

SANTOS, A. F., LUZ, L. A., ARGOLO, A. C., TEIXEIRA, J. A., PAIVA, P. M., COELHO, L. C. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process biochemistry**, v. 44, n. 4, p.504-508, 2009.

SANTANA, M.A. Isolamento, propriedades biológicas e estudos biológicos de lectina de sementes da macrotylomaaxillare (E.Meyer). [S.1] Universidade de ouro preto, 2004.

SANTI-GADELHA, T., B. A. M, ROCHA, C. A. A, GADELHA., H. C, SILVA., R. E. R, CASTELLON, F. J. T, GONÇALVES., D. O, TOYAMA., M.H., TOYAMA, AJF DE SOUZA, LOS BERIAM,, J. L, MARTINS., P. P, JOAZEIRO., B. S, CAVADA. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. **Pesticide biochemistry and physiology**. v. 103, n.1, p, 15-22, 2012.

TATSUTA, T., SATO, S., SATO, T., SUGAWARA, S., SUZUKI, T., HARA, A., & HOSONO, M. Sialic acid-binding lectin from bullfrog eggs exhibits an anti-tumor effect against breast cancer cells including triple-negative phenotype cells. *Molecules*, 23n. v. 10, p. 2714. 2018.

SILVA-FILHO, F. A., LIMA, M. A. S., BEZERRA, A. M. E., BRAZ FILHO, R., SILVEIRA, E. R. A Labdane diterpene from the aerial parts of *Egletes viscosa* less. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p.1374-1378, 2007.

SINHA, B. K., VAN'T ERVE, T. J., KUMAR, A., BORTNER, C. D., MOTTEN, A. G., & MASON, R. P. Synergistic enhancement of topotecan-induced cell death by ascorbic acid in human breast mcf-7 tumor cells. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 113, p. 406-412, 2017.

SUMMER, SF; HOWELL, A. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin a. **J. Bacteriol.**, V. 32, P 227-237, 1936.

SELL, A.M; COSTA, C.P. Biological Activities Of Pha, Wga, Jacaline And Artocarpine Lectines. **Acta Serium**, v. 22, n. 2, p .297-203, 2000.

SYED, P., GIDWANI, K., KEKKI, H., LEIVO, J., PETTERSSON, K., LAMMINMÄKI, U. (2016). Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. **Proteomics**. V. 16, n. 8, 1257-1265, 2016.

SHARON, N.; GALLAGHER, J. Glycobiology marches on with a subtle blend of tastes and flavours. *current opinion in structural biology*, V.17, P. 495-497, 2007.

TRINDADE, M.B. **purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero artocarpus**. 2005.127f. tese (doutorado em ciências)-intituto de física de são carlos. Universidade de são carlos, 2005.

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

Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochem Mol Biol**. v. 150, p. 45-52, 2008.

TATSUTA, T., SATO, S., SATO, T., SUGAWARA, S., SUZUKI, T., HARA, A., & HOSONO, M. Sialic acid-binding lectin from bullfrog eggs exhibits an anti-tumor effect against breast cancer cells including triple-negative phenotype cells. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2714., 2018.

THAKUR, RANDHIR P.S et al. apparatus for cyclical deposition of thin films. U.S. Patent n. 7,175-713, 2007.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. **Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects**. *Phytochemistry*, 2011. 72: 1538-1550.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant. Sci**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VAKHANIA, M., ALEKSIDZE, N., ALEXIDZE, G. Allocation of Mannose-and N-Acetyl-D-Glucosamine Specific Lectins in Different Parts of Aloe Plants (*Aloe aristata* Haw.) and their Biochemical Characteristics. **Bull. Georg. Natl. Acad. Sci**, v. 10, n. 2, 2016.

VOLPE, A. V. T. et al. Farmacobotânica das Partes Aéreas de *Achyrocline alata* DC. (Asteraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 500-11, 2006.

W. TORRES, A. R. CARABALLO, J., SANABRIA, E., REYES MONTAÑO, E., FERNÁNDEZ ALONSO, J. L., VARROT, A., VEGA, N. Purification and biochemical characterization of at/tn specific lectin from *lepechinia bullata* seeds (LAMIACEAE), 2017.

ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2010.

ZIEGLER. U, GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**. 2004;19:124-28. 12.