



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÍVEL MESTRADO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM RATOS UTILIZANDO
NANOPARTÍCULA CONTENDO LECTINA DE *Cratylia mollis*

ROSIMERE DA SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

RECIFE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÍVEL MESTRADO

ROSIMERE DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM RATOS UTILIZANDO
NANOPARTÍCULA CONTENDO LECTINA DE *Cratylia mollis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Rosimere da

Avaliação da atividade cicatrizante em ratos utilizando nanopartículas contendo lectina de *Cratylia mollis* / Rosimere da Silva. – Recife: O Autor, 2014.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Valéria Wanderley Teixeira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Lectinas 2. Cicatrização de ferimentos I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Teixeira, Valéria Wanderley (coorientadora)

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 242

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Parecer da Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado

ROSIMERE DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM RATOS UTILIZANDO
NANOPARTÍCULA CONTENDO LECTINA DE *Cratylia mollis*

Recife, 26 de Fevereiro de 2014.

A comissão examinadora, composta pelos professores e doutores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a mestranda ROSIMERE DA SILVA como:

Recife, 26 de Fevereiro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
(Presidente)

Prof^a Dr^a Valéria Wanderley Teixeira
(Examinadora externa)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Texeira
(Examinador externo)

Prof^a Dr^a Maria das Graças Carneiro da Cunha
(Suplente interna)

Dr^a Cynarha Daysy Cardoso da Silva
(Suplente interna)

DEDICATÓRIA:

Dedico a conclusão desta etapa importante em minha vida, ao meu **Deus**, razão da minha existência. E aos meus pais **Antonio** e **Luzinete**, e meus queridos irmãos (**Samuel, Ismael e Luzimere**), pelo amor, carinho e compreensão. Tenho muito orgulho em tê-los em minha vida. Amo vocês!

“O espírito de Deus me fez, e a inspiração do todo poderoso me deu a vida”. Jó c. 33 v.4

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que Ele é, faz na minha vida. Tudo que tenho e que sou é pela misericórdia e bondade dEle!

Aos meus pais, Antonio Gonçalo e Luzinete Silva, pelo apoio, amor e dedicação, que demonstram nos mínimos detalhes. Meu amor por vocês é incondicional! Aos meus queridos irmãos, Luzimere, Samuel e Ismael, por todo amor e cuidado, vocês são muito importante na minha vida.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Tereza, por toda gentileza, atenção e contribuição para meu crescimento profissional. Aos professores doutores, Álvaro Aguiar e Valéria Wanderley, por ter me ajudado muito no início do meu desenvolvimento acadêmico, aprendi muito com vocês, serei sempre grata por tudo que vocês me proporcionaram.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. A secretária Adenilda Eugênia, pela atenção e ajuda. A turma do mestrado, pelos momentos compartilhados.

Aos meus amigos pelo apoio, carinho e companheirismo. Aos que mesmo distante, mas não se esquecem de mim, oram e se preocupam de verdade comigo. Os verdadeiros amigos tornam tudo mais fácil e divertido, cada um tem um significado especial. Deus abençoe a todos!

Ao Presbítero Walber Gustavo, da Igreja Assembleia de Deus em Pernambuco, pelo incentivo e pelas orações.

Aos que me ajudaram diretamente na execução do projeto, Rayana Apolinário, Clovis Lapa, Fernanda Pacífico e Paulo Soares, por todo apoio e disponibilidade.

Agradeço especialmente a minha amiga e irmã em Cristo, Carina Helena por todo carinho e companheirismo. Nossa amizade Deus escreveu, Ele sabia que juntas podemos ir muito mais longe. Estaremos sempre unidas, com o mesmo afeto, respeito e cumplicidade. Você tem uma importância ímpar na minha vida. Mesmo nas dificuldades, sorrimos juntas e superamos os desafios, confiando sempre no Deus que servimos.

A todos que me ajudaram do Laboratório de Glicoproteínas, Laboratório de Enzimologia (LABENS) e Laboratório de Biotecnologia. A todos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), principalmente a Médica Veterinária Maria Helena, pela responsabilidade e disponibilidade em ajudar no que foi necessário.

A Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro. Ao pessoal da área de microscopia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), por disponibilizar o uso dos equipamentos.

Enfim, sou grata a todos que contribuíram de alguma forma, para conclusão de mais uma etapa importante na minha trajetória profissional.

RESUMO

SILVA, Rosimere. Avaliação da atividade cicatrizante em ratos utilizando nanopartícula contendo lectina de *Cratylia mollis*. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2014.

Lectinas podem ser compreendidas como sendo proteínas (ou glicoproteínas) de origem não imunológica que se ligam reversivelmente a carboidratos, encontradas em forma livre ou ligadas a superfícies celulares por meio de sítios de ligação em sua estrutura tridimensional. *Cratylia mollis* (feijão camaratu) é uma planta forrageira da Região Semi-Árida do estado de Pernambuco e de suas sementes têm sido purificadas e caracterizadas, formas múltiplas de lectinas: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Estudos demonstraram que Cramoll 1,4 em solução salina promoveu em um menor tempo o efetivo fechamento e reparo de feridas quando comparado com grupo controle (solução salina). Uma estratégia para aumentar a potência de drogas e ao mesmo tempo diminuir sua toxicidade sistêmica, é o seu encapsulamento em hidrogéis, os quais têm se mostrado excelentes ferramentas para veiculação e liberação controlada de drogas, justificando o estudo de cicatrização utilizando hidrogel de quitosana e POLICAJU com a incorporação de Cramoll 1,4. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento de lesões cutâneas experimentais em ratos utilizando hidrogel contendo a lectina de *Cratylia mollis*. Foram utilizados quarenta e cinco ratos, divididos aleatoriamente em três grupos (G1 = Control, G2 = tratamento com hidrogel e G3 = hidrogel contendo 100µl/ml Cramoll 1,4). Estes animais foram divididos de acordo com o tempo de biópsia das lesões cirúrgicas experimentais e tratados topicamente com a lectina de *C. mollis* até o dia da biópsia, ou seja, 2, 7 e 12 dias após a cirurgia. Os animais foram anestesiados por via intramuscular. Para o cálculo da área das feridas, foi realizada a medição de suas bordas, a partir da mensuração diária de sua área, com paquímetro, observando-se o maior e menor diâmetro. As amostras foram fixadas em formaldeído 4%, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson. Os dados foram analisados usando testes não-paramétricos. Após 2, 7 e 12 dias, os animais foram sacrificados. No 2º dia, o G3 apresentou uma maior deposição de tecido de granulação e intenso infiltrado inflamatório. No 12º verificou-se a caracterização de papilas dérmicas nos animais tratados com hidrogel e hidrogel Cramoll 1,4, sendo mais expressiva a presença de papilas e maior organização da matriz extracelular no G2. Neste mesmo período, verificou um intenso infiltrado inflamatório e contração da área das lesões cutâneas no G3. Houve uma diminuição do número de eritrócitos, aumento da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), no período de 12 dias no G3. Quanto à deposição de colágeno, houve diferenças significativas apenas no G3 em relação ao G1 no 7º dia, e uma redução significativa no G1, em relação ao G2 e G3 no 12º dia. Nossos resultados demonstraram, que a Cramoll 1,4 intensificou o processo inflamatório, contração mais efetiva das lesões e maior deposição do tecido de granulação, demonstrando que a Cramol 1,4 associada ao hidrogel de quitosana e policaju foi eficaz no processo cicatricial, ampliando assim o conhecimento do potencial da Cramoll 1,4, no reparo de lesões cutâneas experimentais.

Palavras chave: Cicatrização; Cramoll 1,4; Hidrogel; *Cratylia mollis*.

ABSTRACT

SILVA, Rosimere. Evaluation of the healing activity in rats using nanoparticle containing lectin *Cratylia mollis*. 2014. Dissertation (MA in Biology) - Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, 2014.

Lectins can be understood as proteins (or glycoproteins) non-immune origin which bind reversibly to carbohydrates found in free or bound to cell surfaces formed by the binding sites on its three dimensional structure. *Cratylia mollis* (camaratu beans) is a forage plant of Semi-Arid Region of Pernambuco and its seeds have been purified and characterized, multiple forms of lectins: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4. Studies have shown that Cramoll 1.4 in saline promoted in a shorter effective closure and wound repair compared with control group (saline). A strategy to enhance the potency of drugs while decreasing its systemic toxicity, is its encapsulation in hydrogels, which have proved to be excellent tools for placement and controlled drug release, justifying the study of healing using chitosan hydrogel and POLICAJU with the addition of 1.4 Cramoll. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of treatment of experimental cutaneous lesions in rats using hydrogel containing the lectin *Cratylia mollis*. Forty-five rats were randomly divided into three groups (G1 = Control , G2 = treatment with hydrogel and G3 = hydrogel containing 100µl/ml Cramoll 1.4). These animals were divided according to experimental time of biopsy and surgical wounds topically treated with lectin mollis C. until the day of biopsy, or 2, 7 and 12 days after surgery. The animals were anesthetized via intramuscular. To calculate the area of the wounds, the measurement of its edges was performed from the daily measurements of the area with a caliper, noting the larger and smaller diameter. The samples were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. After microtome, sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. Data were analyzed using nonparametric tests. After 2, 7 and 12 days, the animals were sacrificed. On the 2nd day, the G3 had a greater deposition of granulation tissue and intense inflammatory infiltrate. On the 12th there was the characterization of dermal papillae in the animals treated with hydrogel and hydrogel Cramoll 1.4, being more expressive presence of papillae and largest organization of extracellular matrix in G2. In the same period, found an intense inflammatory infiltrate and contraction of the area of skin lesions in G3. There was a decrease in the number of erythrocytes, increased mean corpuscular hemoglobin (HCM) and mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), within 12 days in the G3. As for collagen deposition, there were significant differences in G3 compared to G1 on the 7th day, and a significant reduction in the G1, the G2 and G3 on the 12th day. Our results showed that the 1.4 Cramoll intensified the inflammatory process, more effective contraction of injuries and greater deposition of granulation tissue, demonstrating that Cramol 1.4 associated with the chitosan hydrogel and POLICAJU was effective in the healing process, thus expanding knowledge of the potential of Cramoll 1.4, the repair of experimental skin lesions.

Keywords: Healing; Cramoll 1.4; Hydrogel; *Cratylia mollis*.

LISTA DE FIGIRAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Principais estruturas e camadas da pele.....	18
Figura 2: Camadas da epiderme.....	18
Figura 3: <i>Cratylia mollis</i> Mart.: arbusto e sementes.....	31

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1: A - D: Produção de feridas cutâneas experimentais. T0 - feridas cirúrgicas experimentais. A ferida foi feita através de um molde de 0,5 cm de diâmetro; T2 - Presença da crosta; T7 - formação de tecido cicatricial e T12 - cicatriz. As imagens são representativas dos animais de G3. E - G: Avaliação macroscópica do tecido da cicatriz e contração das lesões cutâneas em grupos experimentais após doze dias de tratamento. E - G1, F e G - G2, G3, respectivamente. A área de contração foi medida usando um paquímetro.....56

Figura 2: Observação de parâmetros clínicos. A - C: Análise clínica 24 horas após o procedimento cirúrgico. Notar edema e hiperemia no A - G1, B e C - G2 e G3, respectivamente. Nota maior hiperemia, e menor evidência de edema no G3. D - F: Análise da formação de crosta no 7º dia. D - G1, E - G2 e F - G3. Notar crosta mais espessa no G2 e G3.....56

Figura 3: Percentual de contração das feridas após doze dias de tratamento. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P=0,0077$).....58

Figura 4: Presença de infiltrado inflamatório nas lesões cutâneas após dois dias de tratamento. A - controle, B - Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Observe a presença de infiltrado inflamatório mais intenso no grupo hidrogel/cramoll 1, 4. A - controle, B - Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Notar maior intensidade de tecido de granulação no grupo hidrogel/Cramoll 1.4. Coloração H.E. Barra de escala: 20µm. Seta longa - infiltrado inflamatório; Cr - Crosta; TG - tecido de granulação; setas longas - infiltrado inflamatório; ponta de seta - adipócitos.....58

Figura 5: Processo de reepitelização e infiltrado das feridas experimentais após doze dias de tratamento. A - Controle, B - Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Notar a presença de papilas dérmicas nos grupos hidrogel e hidrogel/Cramoll 1,4. A - Controle, B - Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Observar a presença de infiltrado inflamatório mais intensa no hidrogel/cramoll1, 4 grupo. Coloração H.E. Barra de escala: 20µm. EP. - Epitélio; PD -

papilas dérmicas; Asterisco – Queratina; Seta longa - infiltrado
inflamatório.....59

Figura 6: Quantificação de fibras colágenas após dois dias de tratamento. Médias seguidas
pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-
Whitney (P=0,1639).....60

Figura 7: Quantificação de fibras colágenas após sete dias de tratamento. Médias seguidas
por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-
Whitney (P=0,0137).....60

Figure 8: Quantificação de fibras colágenas após doze dias de tratamento. Médias seguidas
por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-
Whitney (P=0,0057).....61

LISTA DE TABELA DO ARTIGO

Tabela 1: Efeito da administração tópica de hidrogel contendo 100µg de Cramoll 1,4/mL sobre os parâmetros hematológicos (eritrograma e contagem de plaquetas) de camundongos. G1 = controle. G2 = hidrogel. G3 = hidrogel/Cramoll 1,4. Média ± DP (n = 5). Diferenças estatisticamente significativa: $p < 0,05$57

Tabela 2: Efeito da administração tópica de hidrogel contendo 100µg de Cramoll 1,4/mL sobre os parâmetros hematológicos (Leucograma) de camundongos. G1 = controle. G2 = hidrogel. G3 = hidrogel/Cramoll 1,4. Média ± DP (n = 5). Diferenças estatisticamente significativa: $p < 0,05$57

LISTA DE ABREVIACÕES

CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo

CYR61 – Indutor angiogênico rico em cisteína-61

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FGFs – Fatores de crescimento de fibroblasto

GM-CFS – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GP IIb/IIIa – Receptor plaquetário

GRO- α – Oncogene relacionado ao crescimento α

HGF – Fator de crescimento dos hepatócitos

IFN- γ – Interferon gama

KGF – Fator de crescimento de queratinócitos

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1

NAGase – Enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase

NGF – Fator de crescimento neural

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PIGF – Fator de crescimento placentário

PMN – Leucócitos polimorfonucleares

PPARs – Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RANTES – Regulado por ativação, expresso e secretado por células T normal

TGF- β - Fator transformador do crescimento beta

Th1 – Linfócitos T helper 1

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS	
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 A PELE.....	17
2.1.2 Aspectos Gerais.....	17
2.1.3 Cicatrização.....	17
2.1.4 Fases do processo de cicatrização.....	19
2.2 HIDROGÉIS.....	20
2.2.1 Aspectos Gerais.....	25
2.2.2 Aplicações Biológicas.....	26
2.3 QUITOSANA: ESTRUTURA E APLICAÇÕES.....	27
2.4 GOMA DO CAJUEIRO: ASPECTOS GERAIS E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	28
2.5 LECTINAS.....	29
2.5.1 Aspectos Gerais.....	29
2.5.2 Propriedades Biológicas.....	30
2.5.3 Lectinas de <i>Cratylia mollis</i>.....	31
2.5.4 Tratamentos tópicos de lesões cutâneas utilizando lectina.....	32
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	44
5. ANEXO (NORMAS DA REVISTA).....	62

1. INTRODUÇÃO

Lectinas podem ser compreendidas como sendo proteínas (ou glicoproteínas) de origem não imunológica que se ligam reversivelmente a carboidratos (GHOSH et al., 1999; SUN, 2007), encontradas em forma livre ou ligadas a superfícies celulares por meio de sítios de ligação em sua estrutura tridimensional.

As lectinas participam de importantes eventos biológicos tais como: recrutamento de mastócitos (BURANELLO et al., 2010), atividade antibacteriana (MUKHERJEE et al., 2014), atividade antifúngica (GOMES et al., 2012), imunomodulatória (MELO et al., 2010), aumento da expressão de citocinas (MELO et al., 2011), reparação tecidual de lesões cutâneas (PEREIRA et al., 2012), entre outros. Estas proteínas podem ser encontradas em bactérias, vírus, fungos, animais e plantas, porém as mais conhecidas são encontradas em sementes de leguminosas (NASI, PICARIELLO; FERRANTI, 2009), chegando a constituir até 10 % da proteína total (SHARON; LIS, 1990). São conhecidas por sua habilidade de aglutinar células, especialmente eritrócitos de diferentes espécies animais (CORREIA; COELHO, 1995).

Cratylia mollis Mart. (feijão camaratu) é uma planta forrageira da Região Semiárida do estado de Pernambuco e de suas sementes têm sido purificadas e caracterizadas, formas múltiplas de lectinas: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Uma preparação contendo as formas 1 e 4 associadas denominada Cramoll 1,4, apresenta especificidade glicose/manose (CORREIA; COELHO, 1995), a mesma observada para Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 4, enquanto Cramoll 3 é uma glicoproteína, específica para galactose (PAIVA; COELHO, 1992). Vários estudos têm demonstrado o perfil imunomodulatório de Cramoll 1,4 (MELO et al., 2010a; MELO et al., 2010b; MELO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013), como caracterização de tecidos cancerígenos humanos (BELTRÃO et al., 1998; LIMA et al., 2010), atividade mitogênica em linfócitos humanos (MACIEL et al., 2004; MELO et al., 2011). Cramoll 1,4 promoveu 41% de inibição tumoral (sarcoma 180) quando aplicada na forma livre; encapsulada esta atividade aumentou para cerca de 80 %, além de eliminar efeitos hepatotóxicos provocados pela lectina livre (ANDRADE et al., 2004). Estudos demonstraram que Cramoll 1,4 em solução salina promoveu em um menor tempo para o efetivo fechamento e reparo de feridas quando comparado com grupo controle (solução salina) (MELO et al., 2011).

Lesões são ferimentos onde há destruição total ou parcial de tecidos do organismo afetado em virtude da força de ação de um agente externo. Segundo Pope (1996), todas as feridas ou incisões da pele sejam elas ocluídas com sutura ou tratadas como feridas abertas, passam pela mesma sequência de eventos químicos e celulares de reparação e cicatrização

observados na cura das feridas em outros tecidos. Clinicamente, divide-se o processo cicatricial em três fases: fase Exsudativa ou Inflamatória; fase Proliferativa ou Fibroplasia e fase de Maturação ou Contração (JORGE; DANTAS, 2003; ROBBINS, 2000). Compreender o processo cicatricial é de grande importância para a avaliação evolutiva da ferida e fundamental para um diagnóstico correto a respeito da fase em que esse processo se encontra e consequentes medidas terapêuticas que podem ser prescritas para o tratamento ideal da lesão. Estudos relatam que os hidrogéis têm sido utilizados, na entrega de drogas e macromoléculas bioativas.

Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de materiais naturais ou sintéticos. Hidrogéis preparados a partir de polímeros naturais podem apresentar propriedades mecânicas não satisfatórias e podem conter patógenos ou evocar respostas inflamatórias, apesar de apresentar propriedades vantajosas como: biocompatibilidade; biodegradabilidade e reconhecimentos de moléculas biológicas (LIN; METTERS, 2007). Já os hidrogéis sintéticos, não apresentam propriedades bioativas, o que diminui o campo de aplicação desses materiais, principalmente nas áreas biomédicas.

A avaliação *in vivo* do hidrogel de álcool polivinílico e quitosana contendo minociclina na cicatrização de feridas demonstrou que melhorou significativamente o processo de cicatrização, quando comparado com o grupo controle, grupo tratado apenas com o hidrogel e com a droga convencional (SUNG et al., 2010).

O uso de novas proteínas bioativas em tratamento médico depende do desenvolvimento de sistemas de entrega de droga para superar desvantagens relacionadas a estabilidade destas macromoléculas. Proteínas e peptídeos são rapidamente retirados da circulação quando administradas de modo intravenoso ou subcutâneo requerendo frequente injeção para manter níveis terapêuticos. Uma estratégia para aumentar a potência de drogas e ao mesmo tempo diminuir sua toxicidade sistêmica, é o seu encapsulamento em hidrogéis, os quais têm se mostrado excelentes ferramentas para veiculação e liberação controlada de drogas. Já tem relatos na literatura da atividade cicatrizante da Cramoll 1, 4 livre, e também da quitosana e do POLICAJU, entretanto, não há relatos da associação dessa lectina com esses compostos. O hidrogel além de ter sido utilizado como veículo de entrega da proteína, foi avaliado também o potencial cicatrizante dessa associação, justificando o estudo de cicatrização utilizando hidrogel de quitosana e POLICAJU, contendo a Cramoll 1,4.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento de lesões cutâneas experimentais em camundongos utilizando hidrogel de quitosana e POLICAJU, associado a lectina Cramoll 1,4.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter Cramoll 1,4 por protocolo previamente estabelecido.
- Obter o hidrogel de quitosana e POLICAJU contendo Cramoll 1,4.
- Realizar o tratamento tópico diário de lesões cutâneas experimentais em camundongos utilizando o hidrogel de quitosana e POLICAJU contendo Cramoll 1,4.
- Acompanhar a evolução do processo de reparo tecidual do ponto de vista clínico (avaliação clínica das feridas e mensuração de sua área) durante 12 dias.
- Acompanhar a cicatrização do ponto de vista histopatológico e histoquímico através de biópsias no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório, e coleta do sangue para o hemograma.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Pele

2.1.1 Aspectos gerais

Histologicamente a pele é constituída por três camadas: **epiderme**, **derme** e **hipoderme** (**Figura 1**). A epiderme é de origem ectodérmica, enquanto a porção conjuntiva de origem mesodérmica é a derme. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas lhe serve de união com os órgãos subjacentes. É constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. As células mais abundantes nesse epitélio são os queratinócitos. Na epiderme ainda são encontradas três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004, p. 359). A epiderme origina apêndices, incluindo glândulas sudoríparas, folículos pilosos, unhas, e as suas glândulas sebáceas associadas (BLANPAIN; FUCHS, 2009).

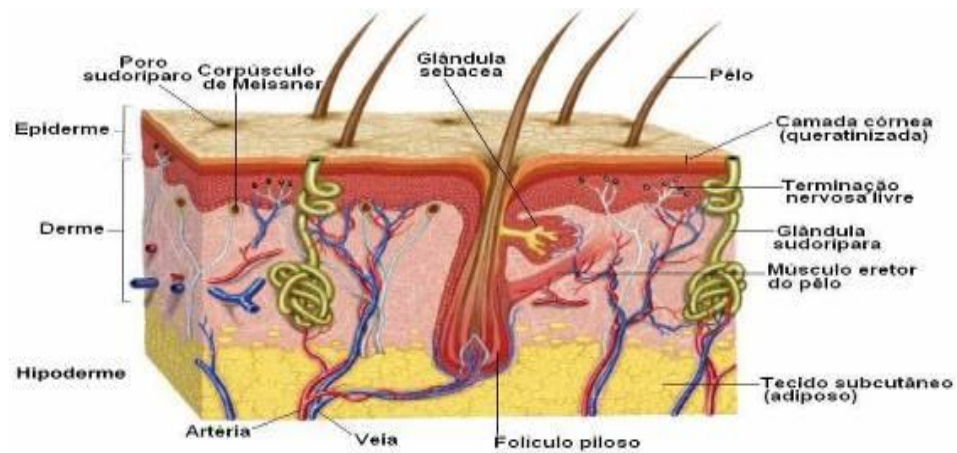
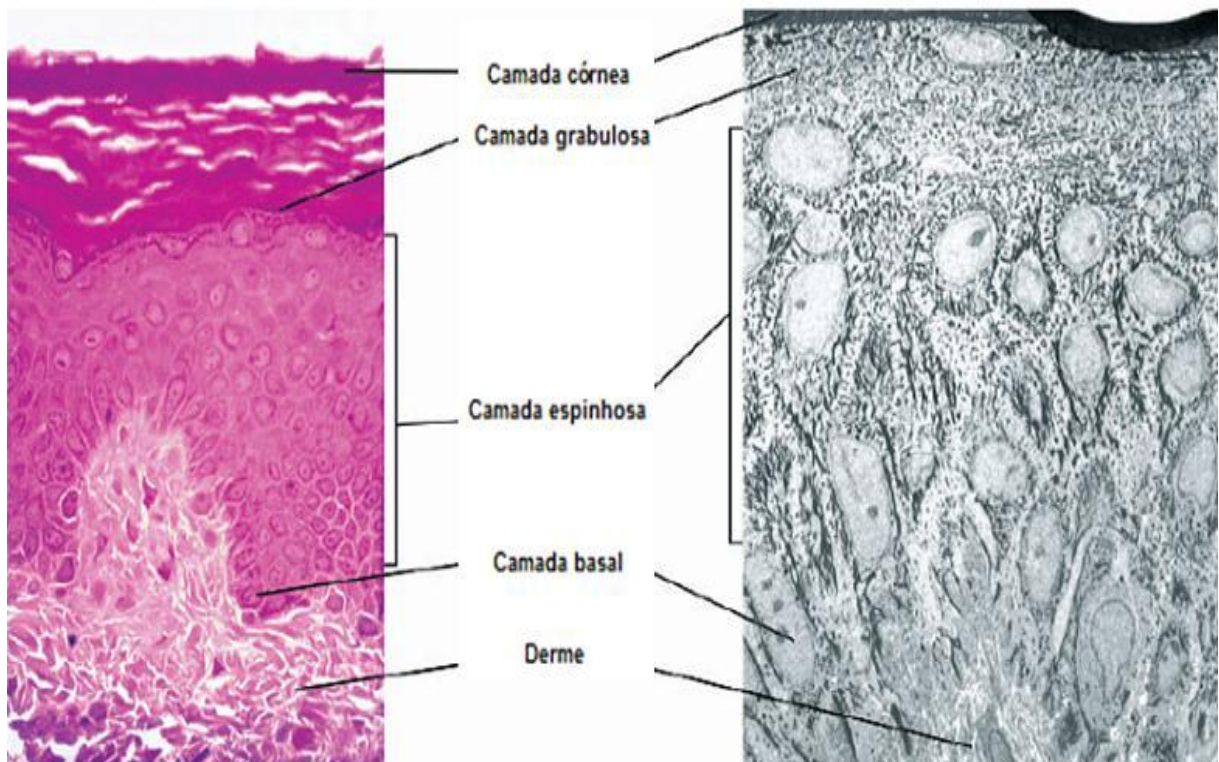


Figura 1: Principais estruturas e camadas da pele. **Fonte:** http://cienciasete.blogspot.com.br/2010_09_01_archive.html.

A pele espessa vista da derme para superfície, apresenta cinco camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida (mais evidente na pele espessa) e camada córnea. Na pele fina, a epiderme é mais simples, faltando frequentemente às camadas granulosa e lúcida, e apresentando uma camada córnea reduzida (**Figura 2**).



(1)

(2)

Figura 2: Camadas da epiderme. (1) Microscopia óptica e (2) Microscopia eletrônica. **Fonte:** HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002.

Os melanócitos são células da camada basal, que estendem seus prolongamentos até as outras células epidérmicas e sintetizam pigmentos de melanina com ação protetora contra a radiação ultravioleta. As células de Langerhans são suprabasais, as quais reconhecem e processam sinais antigênicos e os comunicam às células linfoides. Enquanto, as células de Merkel, basais, são neuroendócrinas, as quais atuam na proliferação de queratinócitos e parecem ter papel na regulação de doenças cutâneas (BOULAIS et al., 2009).

Por não possuir vascularização a epiderme recebe seus nutrientes por contiguidade com a derme. A derme, por sua vez, é definida como uma rígida matriz de tecido conjuntivo de suporte, contendo estruturas especializadas dispostas imediatamente abaixo e intimamente conectadas à epiderme (GAWKRODGER, 2002).

A derme apresenta espessura variável de acordo com a região observada. Sua superfície é irregular, observando-se saliências, as papilas dérmicas, que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. A derme é constituída por duas camadas, de limites pouco distintos: a papilar, superficial, e a reticular mais profunda. A camada papilar é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. A camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado. A hipoderme é a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia. Dependendo da região e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo que, quando desenvolvida, constitui o pânículo adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004, p. 365). As fibras colágenas correspondem cerca de 70% da derme e são responsáveis pela rigidez e força desta camada. Além disto, a fisiologia e a reparação da pele dependem da síntese e da degradação do colágeno (AZULAY, R.; AZULAY, D., 1999).

2.1.2 Cicatrização

Entende-se por cicatrização, como processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, quer a lesão tenha sido traumática ou necrótica (PANOBIANCO et al., 2012). Esse processo consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido (GILLTZER; GOEBELER, 2001; MARTIN; LEIBOVICH, 2005; ORTONNE; CLÉVY, 1994). É dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: hemostasia, fase inflamatória, formação do tecido de granulação, com deposição de matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares), e remodelação (BRANSKI et al., 2005; MENDONÇA et al., 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2006; SHIMIZU, 2005). Depende de

fatores como: tipo de pele, localização anatômica, idade (JULÍA et al. 1992), estado de saúde e nutricional do paciente, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, uso de drogas sistêmicas e ressecamento do leito da ferida durante a cicatrização (DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; LAZAROV; STRATIEV, 1993; MANDELBAUN).

2.1.3 Fases do processo de cicatrização

➤ Hemostasia e Fase Inflamatória

O processo de cicatrização tem como finalidade restabelecer a homeostasia tecidual (CAVALCANTE et al., 2012). Logo no início do processo, há diminuição do afluxo sanguíneo pela vasoconstrição. Plaquetas são ativadas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, fazendo com que tenha início os processos de adesão e agregação celular (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Simultaneamente, o fibrinogênio sérico é clivado pela trombina resultante das vias de coagulação, formando monômeros de fibrina que se polimerizam pela ação do fator XIII, para que, junto com plaquetas, forme-se um tampão hemostático e não haja mais perda de sangue (KIERSENBAUM, 2004). Em resposta a produção endotelial de eicosanoides e leucotrienos, há um aumento progressivo da permeabilidade vascular às células migrantes e substâncias biologicamente ativas (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Deste processo surgiram elementos essenciais para a continuação fisiológica da cicatrização: um arcabouço de fibrina, necessário para a migração das células que chegarão, e os primeiros fatores de crescimento com atividade. Estes últimos são polipeptídeos secretados na ferida que podem ter como função estimular ou inibir a síntese de determinadas proteínas, além de atuarem na ativação e migração de células (GUYURON et al., 2009).

Concomitantemente, a vasodilatação, extravasa das vênulas um líquido contendo substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e enzimas. Isso é a chave para todos os eventos inflamatórios subsequentes. O aumento dessa permeabilidade vascular é causado pela histamina, embora a serotonina e quininas também estejam envolvidas. A ação dessas aminas resulta em tumefação de curta duração das células do endotélio vascular, criando intervalo entre as células, para que posteriormente possa passar células de defesa (JOHNSTON, 1981; SWAIM, 1980).

São característicos da fase inflamatória: presença de eritema, calor, edema e dor. As plaquetas afluem para a ferida, com a função de formar a placa de fibrina, produzir substância quimiotática e fatores de crescimento (MARTIN; LEBOVICH, 2005; PELED et al., 2000). A fase inflamatória é dividida em fase humoral e celular, ocorre logo após o trauma,

caracterizando-se por alterações microcirculatórias tais como: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de plasma no local da ferida, caracterizando exsudato inflamatório. Ao mesmo tempo, inicia-se a resposta celular representada pela ação dos macrófagos e neutrófilos (MARTIN; LEIBOVICH, 2005; MODOLIN; BEVILACQUA, 1985).

As principais células de uma ferida são os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos, os quais aparecem proporcionalmente à sua quantidade presente na circulação. Na fase inicial o tipo de célula predominante é o PMN, tem vida breve e atua principalmente com função fagocítica (NETO, 2003), surge durante a injúria tissular e permanece por período que varia de três a cinco dias, sendo responsáveis pela fagocitose de bactérias. Os macrófagos apresentam capacidade fagocítica, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos e fonte de fatores de crescimento e mediadores bioquímicos que ditam e sustentam o processo de cicatrização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Entre os fatores de crescimento que são secretados pelas plaquetas, destacam-se PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β (fator transformador do crescimento beta), que neste primeiro momento terão como função atrair neutrófilos e monócitos, e estimular o EGF (fator de crescimento epidérmico), que será mais ativo na fase proliferativa (BARRIENTOS et al., 2008). Uma vez ativadas, as plaquetas aumentam a ação da protrombinase, que promove maior produção da trombina, a partir da protrombina, criando assim, condições para a amplificação da adesão plaquetária. O ADP liberado das hemácias e grânulos densos das próprias plaquetas é outro elemento amplificador da agregação das plaquetas. Este induz nelas a exposição do receptor GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de von Willebrand (COELHO et al., 1998; LEFKOVITS; PLOW; TOPOL, 1995; WILLERSON, 1995).

As células fagocitárias, neutrófilos e macrófagos, degradam elementos da matriz extracelular e tecido necrótico para facilitar a migração celular no leito cruento, utilizando para isso além da fagocitose, metaloproteinases (proteinases de elementos da matriz). Macrófagos também são importantes por produzirem uma diversidade de fatores de crescimento, dentre os quais se incluem: EGF, FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), PDGF, TGF- β e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (KIERSZENBAUM, 2004).

➤ **Fase Proliferativa**

Nessa fase ocorrem a fibroplasia, angiogênese e reepitelização. Na fibroplasia ocorrerão migração e proliferação de fibroblastos, concomitante à síntese de novos

componentes da matriz extracelular (SINGER; CLARK, 1999). Os fibroblastos são células fusiformes com núcleo elíptico (KIERSZENBAUM, 2004).

Inicialmente após a lesão, as células mesenquimatosas indiferenciadas começam a transformar-se em fibroblastos migratórios (JOHNSTON, 1981; SILVER, 1982). Os fibroblastos estão sujeitos a mudanças devido às forças mecânicas submetidos durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas (HILDEBRAND et al., 2005; KESSLER et al., 2001).

À medida que ocorre o aumento do número de fibroblastos ativados, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região. Além da ação direta de fatores de crescimento sobre as células da vasculatura, a indução da angiogênese é, em parte, creditada à baixa tensão de oxigênio característica que ocorre no centro de uma ferida (KNIGHTON; SILVER; HUNT, 1981).

A angiogênese é essencial porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY; DUDLEY, 1988). Quando estimuladas por fatores de crescimento e outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal e permite a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região da lesão. Uma vez na região externa do vaso, elas passam pelo processo de diferenciação para aquisição da capacidade de formação de novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990).

Os fibroblastos iniciam a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento dos capilares (angiogênese) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Como consequência da angiogênese, o tecido conjuntivo é formado, recebendo a denominação de tecido de granulação, devido a sua aparência granular, pela presença de inúmeros capilares (WERNER; GROSE, 2003).

A maioria dos mediadores envolvidos na fibroplasia como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemotactic protein-1*), Isoleucina 8 (IL-8), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF, do inglês *connective tissue growth factor*), indutor

angiogênico rico em cisteína-61 (CYR61, do inglês *cysteine-rich, angiogenic inducer, 61*), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CFS, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs, do inglês *fibroblast growth factors*), e fator de crescimento neural (NGF, do inglês *nerve growth factor*) também possuem atividade angiogênica. O papel do MCP-1 na angiogênese, dentre outros efeitos, foi demonstrado em estudos com camundongos *knockout* para esta proteína por Low et al. (2001).

In vitro, CTGF promove a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais e, *in vivo* induz angiogênese (BABIC; CHEN; LAU, 1999; HUTSON et al., 1979), juntamente com a CYR61 (BABIC et al., 1998). O papel do GM-CFS sobre a migração e proliferação de células endoteliais foi estudado por BUSSOLINO et al. (1989) e a demonstração de que FGF1 e FGF2 estimulam a angiogênese em vários modelos de ensaios foi descrita por Risau (1990). Além das proteínas citadas acima, outros sinalizadores contribuem para a formação de novos vasos. O primeiro deles é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*). A família do VEGF inclui 6 membros conhecidos como VEGF ligantes: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (PIGF) (HOEBEN et al., 2004).

A fase de epitelização caracteriza-se pelo encontro das bordas da lesão. Nesta fase, há migração de queratinócitos não danificados das bordas das feridas e dos anexos epiteliais para o tecido de granulação. Fatores de crescimento são prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio (CHRISTOPHER, 1972; GRINNELL, 1992; WERNER & GROSE, 2003). A epitelização só acontece em meio úmido onde o movimento dos queratinócitos migrantes é determinado pelo conteúdo de água no leito da ferida. Feridas abertas e ressecadas reepitelizam mais lentamente do que as ocluídas (BRUIN et al., 1990; WINTER, 1962).

Entre os fatores que facilitam a reepitelização estão à presença de fator de crescimento dos hepatócitos (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*), FGFs, fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês *epidermal growth factor*), fator de crescimento de queratinócitos (KGF do inglês *keratinocyte growth factor*), estímulos a receptores peroxissomo-proliferador-ativados (PPARs, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*) e de um campo elétrico na ferida. O HGF, secretado por células mesenquimais juntamente com FGFs, EGF e KGF, favorece a proliferação dos queratinócitos e atua como quimioatraente (GURTNER et al., 2008; SINGER; CLARK, 1999) enquanto que a estimulação de PPARs por citocinas pró-inflamatórias diminui a apoptose e favorece a migração dessas células. Já a formação de um

campo elétrico endógeno no plano lateral, entre as margens da ferida, se desenvolve de maneira a direcionar a migração de queratinócitos através de moléculas de sinalização celular (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

➤ Fase de Remodelação

Na fase de remodelagem ocorre do número de vasos sanguíneos, além de perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz (VIEIRA; MAGALHÃES; BAJAI, 2002).

Nessa etapa ocorre a mudança do tipo de colágeno que a compõe e de sua disposição. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o colágeno tipo I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos. Juntamente com a substituição do tipo de colágeno, ocorre uma alteração em sua organização, a qual muda de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de *stress* (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; SINGER; CLARK, 1999).

Quanto maior o número de ligações covalentes transversais, maior a resistência da cicatriz. Quando secretado na forma de tropocolágeno, as ligações transversais das fibras se dão por pontes de hidrogênio. No processo de amadurecimento da fibra, as lisinas, hidroxilisinas e lisinas glicosiladas constituintes da molécula de tropocolágeno são oxidadas até aldeídos pela enzima lisiloxidase. Estes, após a oxidação, se ligam covalentemente com outros grupos aldeídos ou com lisinas não oxidadas, o que aumenta a resistência da fibra. Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparece, observando-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando finalmente o tecido cicatricial (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (TODD et al., 1991).

Com relação à modelagem da matriz extracelular, quimiocinas como IL-8, regulado por ativação, expresso e secretado por células T normal (RANTES, do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α , do inglês *macrophage inflammatory protein-1 α*), MIP-1 β e MCP-1, além de suas ações quimioatraentes sobre neutrófilos e macrófagos, induzem a expressão de metaloproteinases em vários tipos de leucócitos (DIPIETRO et al., 1995, 2001; D'SOUZA et al., 2001). Exemplos de mediadores relacionados à angiogênese e com influência direta sobre as células de revestimento são o VEGF-A e o PLGF. A expressão desses apresentam-se

também aumentada durante a migração de queratinócitos (FAILLA et al., 2000). Outros dois mediadores que participam da reconstrução epitelial além de suas ações angiogênicas são o HGF e o oncogene relacionado ao crescimento α (GRO- α , *growth-related oncogene α*). O HGF foi inicialmente descoberto como um poderoso mitógeno de hepatócitos. Na região da ferida, este fator auxilia na recomposição celular e estimula a dissociação das células epiteliais (COMOGLIO; BOCCACCIO, 2001). Alguns mediadores são críticos para um determinado evento e sua ausência termina por comprometer seriamente o reparo de tecidos. Assim, para melhor entendimento do processo como um todo, torna-se necessária a explanação das conhecidas influências de cada um deles em situações experimentais (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

2.2 Hidrogéis

2.2.1 Aspectos gerais

Os hidrogéis caracterizam-se por apresentar forte afinidade pela água devido à presença de grupos hidrofílicos, tais como: -OH, -COOH, -CONH₂, -SO₃H, entre outros (MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008). Podem ser formados por polímeros naturais (BOUCARD et al., 2007; TADA et al., 2007; ZHANG et al., 2005), tais como ácido hialurônico, alginato, quitosana; por polímeros naturais modificados (COVIELLO et al., 2007), por exemplo dextrana reticulada, galactomanana metacrilatada; e por polímeros sintéticos como por exemplo o hidrogéis quimicamente modificados de poli (álcool vilínico) PVA-GMA/metacrilato de glicidilo (GMA) e PVA-GMA/CS/ condroitina sulfato (CS) (CRISPIM, et al., 2012).

A característica comum dos polímeros sensíveis à temperatura é a presença de grupos hidrófobos, tais como metil, etil e propil. Todos os polímeros sensíveis ao pH contêm componentes ácidos (por exemplo, ácidos carboxílicos e sulfônicos) ou básicos (por exemplo, sais de amônio) ou grupos que aceitam ou liberam prótons em resposta a mudanças no pH. Os polímeros com um grande número de grupos ionizáveis são conhecidos como polieletrólitos (QIU; PARK, 2001).

Os hidrogéis hidrofílicos se assemelham ao tecido vivo natural mais do que qualquer outra classe de biomateriais sintéticos, devido ao seu elevado teor de água, por outro lado, os elevados teores de água dos materiais contribuem para a sua biocompatibilidade. A este respeito, os polímeros de mudança de fase, os quais podem desencadear liberação do fármaco em resposta a estímulos externos, são os mais investigados. Hidrogéis com tais propriedades pode sofrer transições de fase de volume reversíveis ou transições de fase sol-gel sobre as

mudanças na condição ambiental. Estes polímeros “inteligentes” ou "smart" desempenham um papel importante na entrega da droga, uma vez que podem ditar não só onde a droga é entregue, mas também quando e com que intervalo é liberada (SOPPIMATH et al., 2002).

Recentemente, estudos demonstraram a síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamida-acrilato e caulim. A caracterização pode ser feita através da análise química (método de fusão e fluorização), umidade e perda ao fogo, espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios-X. Os estudos das propriedades podem ser feitos através de experimentos de intumescimento, efeito de força iônica e pH (BRITO et al., 2013).

2.2.2 Aplicações biológicas

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato demonstrou alta celularidade e um aumento na produção de matriz pericelular e territorial quando comparada a interterritorial. Além disso, o hidrogel de alginato constituiu um eficiente arcabouço de sustentação e cultura de condrócitos, mantendo seu fenótipo arredondado, assemelhando-se a cartilagem nativa, sendo um importante arcabouço para uso em implante articular (BITTENCOURT et al., 2009).

O hidrogel de polissacarídeo de melaço de cana de açúcar associado com osso liofilizado é um transportador eficaz para as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) na estimulação da reparação do osso, bem como proporciona uma consistência adequada para o enchimento de defeitos ósseos e propriedades que facilitam a liberação controlada de proteínas (JUNIOR et. al., 2013).

Os hidrogéis são também utilizados para encapsulação e liberação de proteínas. Alguns são termossensíveis, ou seja, a liberação ocorre com mudança de temperatura. Outros são dependentes do pH, liberando a molécula ou fármaco em pH específico. Esses tipos de hidrogéis apresentam vantagens, pois é possível determinar o perfil de liberação através da mudança de temperatura ou do pH. Foram sintetizados hidrogéis e microgéis dependentes do pH, a partir de acetal de reticulação. Este agente de ligação transversal sofre uma degradação catalisada por ácido, com uma meia-vida de 5,5 min, em pH 5,0 e de 24 horas em pH 7,4. Hidrogéis carregados de proteína foram sintetizados com este agente de ligação cruzada, e os seus perfis de liberação foram medidos como uma função do pH. Foram sintetizados também microgéis com tamanhos entre 1 e 10 μm , sendo apropriado para a fagocitose. A sensibilidade ácida, única do agente de ligação cruzada acetal deve torná-lo um intermediário sintético útil como sistema de distribuição de drogas ácido-sensível (MURTY et al, 2002).

Em um estudo avaliando a entrega de proteína IL-2 recombinante (rhIL-2) , *in vivo* e *in vitro*, a partir da formação de hidrogéis *in situ*, demonstrou-se que o efeito terapêutico de rhIL-2, foi retardado por cerca de 1-2 semanas, em comparação com a forma livre de rhIL-2, provavelmente devido a uma liberação lenta e constante de rhIL-2 a partir dos hidrogéis (HIEMSTRA et al, 2007).

Hidrogel contendo meio DMEM/F12 (meio-Az-CH-LA) foi aplicados em uso tópico no tratamento de queimaduras. Os resultados indicaram que as atividades de degradação do meio-Az-CH-LA, podem ser benéficas para a formação do tecido de granulação em feridas profundas de queimaduras (KIYOZUMI et. al., 2007).

2.3 Quitosana: estrutura e aplicações

Quitosana é um copolímero de β [1 $\rightarrow$ 4]-2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucapiranosose. A quitosana é obtida principalmente da desacetilação alcalina da quitina de exoesqueleto de crustáceos, tais como camarão e caranguejos (MUZARELI, 1973). Se a estrutura é mais de 80% acetilada, o polissacarídeo é denominado de quitina. Para cadeias com porcentagem de acetilação menor que 80%, a amostra é denominada quitosana (ABRAN; HIGUEITA, 2004). A alta desacetilação tem sido explorada para investigar métodos de caracterização da quitosana (DOMARD; RINALDO, 1993).

A quitosana possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal chamada celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (GOOSEN, 1996).

Dentre as inúmeras características que distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos destaca-se a atividade antimicrobiana (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitina e a quitosana reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana (tempo de coagulação sanguínea de 3,7 min) mais eficaz que a quitina (tempo de coagulação sanguínea de 4,7 min) na mesma concentração de 0,1 mg/mL, enquanto o tempo de coagulação sanguínea controle é de 12 min, embora a quitina tenha maior capacidade em agregar plaquetas (61,2%) que a quitosana (27,9%). O fato de a quitosana ser mais eficaz na coagulação sanguínea, mesmo quando a quitina tem maior poder de agregação plaquetária, é atribuído à sua capacidade em agregar, também, os eritrócitos (OKAMOTO et al., 2003; RAO; SHARMA, 1997) devido à interação das cargas positivas dos grupos amínicos livres da quitosana com as cargas negativas de receptores dos eritrócitos contendo resíduos de ácido neuramínico (SINGLA; CHAWLA, 2001) e murâmico (RAO; SHARMA, 1997).

Estudos realizados por Okamoto, (2002), sugerem que efeito analgésico da quitosana é principalmente decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . A bradicinina, mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático e outras citocinas, como Fator de Necrose Tumoral α ($\text{TNF}\alpha$, do inglês *tumor necrosis factor α*) e as IL-1 e IL-8, parece ser particularmente importante para a produção da dor no local inflamado (HARDMAN et al., 1996).

A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago (OLSEN et al, 1989) e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade desse polímero no organismo. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam IL-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (BRINE et al., 1992; MUZZARELLI, 1997). Promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que estes polímeros podem prevenir infecções, se aplicados diretamente no local da lesão (KOIDE, 1998).

2.4 Goma do cajueiro: aspectos gerais e aplicações biológicas

O polissacarídeo ou goma extraída do exsudato do cajueiro (POLICAJU) é matéria prima abundante no nordeste do Brasil, lugar provável em que o cultivo da planta tenha se originado com a tradição de exploração pelas tribos indígenas da região (BARROS, 1995).

A reticulação da goma de cajueiro com epicloridrina foi realizada para viabilizar sua utilização como matriz cromatográfica na separação de lectinas. O gel reticulado é capaz de ligar-se a proteínas galactose específica como frutalina, jacalina, lectinas de sementes de *Artocarpus* (LIMA et al., 2002). Hidrogéis foram obtidos por meio de insolubilização da goma do cajueiro por reação de reticulação (SILVA et al., 2006).

Algumas aplicações para goma do cajueiro tem sido proposta, como hidrogel superabsorvente para condicionador do solo (GUILERME et. al., 20005) ou complexo polieletrólítico com quitosana para liberação de fármaco (MACIEL et. al., 2006).

A imobilização da tripsina na película de polissacarídeo de *Anacardium occidentale L.* e sua aplicação como curativo cutâneo em ratos, demonstrou que a goma de *A. occidentale* pode ser considerada uma matriz biodegradável e biocompatível para imobilização de biomoléculas como a tripsina aprisionando em polissacarídeo e celulose mostrou ser um

curativo promissor para ser na cicatrização, podendo ser utilizado em terapia clínica (MONTEIRO et al., 2007).

Estudos demonstram que o extrato de *A. occidentale*, possui atividade antimicrobiana *in vitro*, sobre espécies de *Streptococcus*. A maior eficácia do extrato foi observada foi efetivo na inibição da aderência das três cepas testadas, representada pela ausência de aderência ao vidro na presença de sacarose; particularmente, a maior eficácia do extrato foi sobre o *S. sanguis*, agente mais importante na fase inicial de deposição do biofilme bacteriano (MELO et al., 2006).

2.5 Lectinas

2.5.1 Aspectos gerais

O primeiro relato sobre lectinas ocorreu em 1888, quando Stillmark, ao estudar a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* L. (mamona), observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos, devido à presença de uma proteína extraída, a *ricina*, descoberta que marcou o início das pesquisas envolvendo lectinas (KENNEDY et al., 1995). Pouco tempo depois, outra hemaglutinina, chamada abrina, foi encontrada em sementes de *Abrus precatorius* L. (Jequiriti). Entretanto, o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960, abrindo uma vasta área de aplicação para as lectinas (GABOR et al., 2004).

O termo lectina (originado no latim *lectus*, que significa escolhido, selecionado) foi primeiro empregado por Boyd & Shapleigh em 1954, para designar um grupo de proteínas que apresentava a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um sítio não catalítico, o qual se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específico (PEUMANS; VAN DAMME, 1995, 1998; PEUMANS et al., 2001).

As lectinas estão presentes em todas as classes e famílias de organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), bactérias e vírus. Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas vegetais é obtida de sementes, principalmente leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após germinação (ALENCAR et al., 2005a, LORIS, 2002; SHARON; LIS, 2004).

Estruturalmente as lectinas possuem ampla variedade, sendo comum entre elas a presença de, ao menos, um sítio de ligação a carboidrato (Domínio de Reconhecimento de Carboidrato- CDR) (WEIS; DRICKAMER, 1996).

Para detectar a presença de lectina é realizado um teste pelo ensaio de hemaglutinação em eritrócitos humanos ou de outras espécies animais. O ensaio consiste em uma diluição serial e em seguida, incubação com eritrócitos, onde a atividade hemaglutinante é detectada pela formação de uma malha decorrente da interação entre a lectina e os carboidratos localizados na superfície dos eritrócitos. A capacidade de aglutinação por lectinas pode ser intensificada quando os eritrócitos são submetidos a tratamentos com enzimas ou soluções químicas (COELHO; SILVA, 2000).

2.5.2 Propriedades biológicas

A rápida expansão da biotecnologia na pesquisa farmacêutica tem resultado no desenvolvimento de um enorme número de novas terapêuticas macromoleculares (ABU-DAHAB; SCHAFER; LEHR, 2001). O uso e interesse do potencial biotecnológico das lectinas se dão pelo fato de sua capacidade de ligação a carboidratos com especificidade considerável, sendo excelentes modelos de estudo de interação proteína-carboidrato em nível atômico (RINI, 1995). A associação lectina-carboidrato é o evento primário em muitos processos biológicos como a infecção, diferenciação celular, simbiose de bactérias, formação de órgãos e metástase (SHARON, 1993).

As lectinas de plantas podem assumir diferentes papéis biológicos. Todavia, não existe em função universal para todas elas. De maneira abrangente as lectinas podem ser organizadas em dois grupos segundo seu ligante: podem assumir papéis exógenos ao se associarem a ligantes externos, por exemplo, atividade antifúngica contra fitopatógenos, ou podem assumir papéis endógenos se interagirem com ligantes do próprio organismo, por exemplo, auxiliar a deposição de proteínas de reserva nos corpos protéicos (SHARON; LIS, 2004).

A especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização em pesquisas na área biológica e médica tais como: investigação da superfície de células, caracterização de eritrócitos, como agentes mitogênicos, caracterização de estádios de desenvolvimento de microorganismos diversos, purificação de glicoproteínas, morfologia de neurônios e identificação de conexões neurais no sistema nervoso central (KENNEDY et al., 1995).

2.5.3 Lectina de *Cratylia mollis*: origem e aplicações biotecnológicas

A *C. mollis*, é popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba, é uma planta forrageira da região semiárida do estado de Pernambuco (Figura 3). É perene, de grande resistência à seca e serve de alimentação para o gado tanto no período chuvoso quanto

na estiagem. Pertence à família Fabaceae, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Dioclineae*, a qual contém os gêneros *Canavalia* e *Dioclea*. A *C. mollis* floresce no período de abril a maio e amadurece de julho a agosto produzindo grandes quantidades de sementes com reprodução vigorosa (SILVA; SOUZA, 1986; SILVA, 1992).

A partir das sementes de *C. mollis*, foram purificadas formas múltiplas de lectinas, denominadas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Através de cromatografia de afinidade em Gel Sephadex 75, foi purificada uma preparação contendo as formas 1 e 4 associadas, sendo denominada Cramoll 1,4 (PAIVA & COELHO, 1992; CORREIA & COELHO, 1995).

A Cramoll 1,4 apresenta estabilidade até 80 °C, ponto isoelétrico em torno de 8,6 e caráter básico. Possui ainda uma banda principal de 31 kDa e dois fragmentos da banda principal de 16 e 14 kDa. É fortemente inibida por metil α -D-manosídeo, o que entra em acordo com a classe de lectinas glicose/manose sendo similar as lectinas isoladas das leguminosas *Canavalia ensiformis* e *Lens culinaris* (HONG et al., 2001; LIMA et al., 1997).



Figura 3: *Cratylia mollis*. **A** – arbusto; **B** – sementes. **Fonte:** <http://www.google.com.br/imgres?hl=ptBR&biw=1212&bih=696&tbm>.

A Cramoll 1,4 imobilizada a Sepharose, como matriz de afinidade, foi utilizada para purificar uma proteína de soja, ApcSP, proteína que pode ser de grande importância para terapia anticoagulante e antitrombótica, prolongando o tempo de coagulação e bloqueando a agregação de plaquetas (SILVA et al., 2011). Ainda, a lectina Cramoll 1,4 foi capaz de isolar a enzima aciltransferase, importante no metabolismo do colesterol (LIMA et al., 1997).

A avaliação imunomodulatória de Cramoll 1,4 em linfócitos experimentais, em concentrações não citotóxica, induz uma resposta Th1 através de uma maior produção de IFN- γ e baixa produção de IL-10 e mostra uma resposta antiinflamatória por supressão de óxido nítrico (MELO et al., 2010a). A Cramoll 1,4 aumenta a produção de espécies de oxigênio reativos intracelulares (ROS), os níveis citosólico de cálcio, e a expressão de

citocinas em células de baço de ratos tratados, sem dano aparente a morfologia celular (MELO et al., 2010b).

2.5.4 Tratamentos tópico de lesões cutâneas utilizando lectinas

A aplicação tópica de hidrogel contendo Cramoll 1,4 no tratamento de queimaduras de segundo grau acelera a granulação, retração e o processo reepitelização da ferida (PEREIRA et al., 2012). Ainda, Cramoll 1,4 se mostrou eficaz para a reparação de lesões experimentais em camundongos imunodeprimidos (MELO et al., 2011).

Estudos analisando o perfil de proteases em lesões cutâneas experimentais, tratados com a lectina isolada das sementes de *C. brasiliensis* (ConBr), observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias das feridas dos grupos ConBr e os demais grupos analisados na fase de fibroplasia, sugerindo que a ConBr, quando aplicada topicamente, promove a ativação de células envolvidas no processo cicatricial, favorecendo a evolução do mesmo (SILVA et al., 2009).

Foi avaliado o potencial da lectina de sementes de *Pisum arvense* (PAL), em uma avaliação *in vivo* e *in vitro*, da atividade pró-inflamatória. Para análise *in vivo* foi avaliada a capacidade dessa lectina para induzir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos e quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Os resultados demonstraram que a lectina apresentou atividade pró-inflamatória *in vivo* e *in vitro* (ALENCAR et al., 2005b).

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, A. P.; HIGUERA, I. Generalidades. In:ABRAM, Ana Pastor. **Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones**. Lima, Peru. - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial. 2004. Cap. 1, p.25-65.

ABU-DAHAB, R., SCHAFER, U. F. AND LEHR, C.-M. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.14, 37-46, 2001.

ALENCAR, V. B. M. et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p.1805-1814, 2005a.

ALLENCAR, V. B. M. et al. Lectina of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 375-381, 2005b.

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.435-445, 2004.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **A pele – embriologia, estrutura e fisiologia**, In: **Dermatologia (Revisada e atualizada)**, 2a edição, Editora Guanabara Koogan, Capítulo 1, p. 1-10, 1999.

BABIC, A. M. et al. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 6355-6360, 1998.

BABIC, A. M.; CHEN, C. C.; LAU, L. F. Fisp 12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cells adhesion and migration through integrin α v β 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis *in vivo*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 2958-2966, 1999.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARROS, L. M. Botânica, origem e distribuição geográfica. **EMBRAPA/CNPAT**, 55-71, 1995.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.16, n.5, p.585-601, 2008.

BELTRÃO, E. I. C. et al. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.74, p.125-134, 1998.

BITTENCOURT, R. A. C. et al. Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.17, n.4, p.242-246, 2009.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, p.207-217, 2009.

BOUCARD, N. et al. The of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. **Biomaterials**, v.28, p.3478-3488, 2007.

BOULAIS, N. et al. "Merkel Cells as Putative Regulatory Cells in Skin Disorders: An In Vitro Study", **PLoS One**, v. 4, n. 8, e6528, 2009.

BRANSKI R, C. et al. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**, v.19, n.2, p.283-289, 2005.

BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P., eds.; **Advances in chitin and chitosan**, Elsevier Applied Science: London, 1992.

BRITO, C. W. Q. et al. Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamida-acrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. **Química Nova**, v. 36, n.1, p.40-45, 2013.

BROUGHTON, G.; ANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117(7 Suppl), p.12-34, 2006.

BRUIN, P. et al. A new porous polyetherurethane wound covering. **Journal of Biomedical Materials Research**, USA, v. 24, n. 2, p. 217-226, 1990.

BURANELLO, P. A. A. et al. The Lectin ArtinM Induces Recruitment of Rat Mast Cells from the Bone Marrow to the Peritoneal Cavity. **PLoS ONE** 5, v.5, 2010.

BUSSOLINO, F. et al. Granulocyte and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. **Nature**, v. 337, p. 461-463, 1989.

CAVALCANTE, L. C. et al. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Journal Brazilian Periodontol**, v. 22, n.1, p.69-73, 2012.

CIÊNCIAS Nota 10. Disponível em:

< http://cienciasete.blogspot.com.br/2010_09_01_archive.html > Acesso em: 10 Julho 2013.

CHRISTOPHER, E. Kinetic aspects of epidermal healing. In: MAIBACH, H.; ROOVE, D. (Ed.). **Epidermal wound healing**. St. Louis: Mosby, 1972.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.55, p.261-273, 1995.

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

COELHO, O. R. et al. Glicoproteína IIb/IIIa em isquemia miocárdica. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 8, p. 338-343, 1998.

COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C. Scatter factors and invasive growth. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, p. 153-165, 2001.

COVIELLO, T. et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations, **Controlled Release**, v.119, p.5, 2007.

CRISPIM, E. G. et al. Hydrogels based on chemically modified poly(vinyl alcohol) (PVA-GMA) and PVA-GMA/chondroitin sulfate: Preparation and characterization. **eXPRESS Polymer Letters**, v.6, n.5, p.383-395, 2012.

D'SOUZA, P. J. et al. Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 23531-23538, 2001.

DIPIETRO, L. A. et al. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 868-875, 1995.

DIPIETRO, L. A. et al. Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemo attractant protein-1. **Wound Repair and Regeneration** ., v. 9, p. 28-33, 2001.

DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.5, p.49–52, 1993.

FAILLA, C. M. et al. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 388-395, 2000.

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

GAWKRODGER, D. J. **Dermatology: An Illustrated Colour Text**, 3 ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 2002.

GHOSH, S. et al. Saracin: A lectin from *Saraca indica* Seed Integument Induces Apoptosis in Human T-Lymphocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.371, p.163-168, 1999.

GILLTZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing.USA. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 4, p. 513-521, 2001.

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

GOOSEN, M. E. A – “Applications of chitin and chitosan”, **Technomic Publishing Company**, Lancaster (1996).

GRINNELL, F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. **Journal of Cell Science**, England, v. 101, p. 1-5, 1992.

GUILHERME, M. R. et al. Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl metracrylate. **Carbohydrate Polymers**, n.61 , p. 464, 2005.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, p.314-21, 2008.

GUYURON, B. et al. Plastic surgery: indications and practice. St Louis, MO: **Elsevier**, p.9-26, 2009.

HARDMAN, J. G. et al. As bases farmacológicas da terapêutica, 9a ed.; eds.; **McGraw-Hill: México**, 1996, p. 450.

HIEMSTRA, C. et al. *In-vitro* and *in-vivo* protein delivery from in-situ forming poly (ethylene glycol)- polylactide hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v.119, p.320-327, 2007.

HILDEBRAND, K. A. et al. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Medicine and Arthroscopic Review**, USA, v. 13, n. 3, p. 136-144, 2005.

HOEBEN, A. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n, 56. p.549-580, 2004.

HONG, M. et al. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.752, p.207-216, 2001.

HUTSON, J. M. et al. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. **Nature**, v. 279, p. 793-795, 1979.

HUNTER, J. A. A., SAVIN, J. A., DAHL, M. V. **Clinical Dermatology**, 3 ed., Oxford, Blackwell Publishing, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 12^a ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004, p. 359.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de feridas**. Editora Atheneu. 2003.

JULÍA, V. et al. Características de la cicatrización de las heridas en el período fetal. **Cirugía pediátrica**, Barcelona, v. 5, n. 3, p. 117-121, 1992.

JÚNIOR, M. D. M. et al. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n.4, p.233, 2013.

JOHNSTON, D. E. Skin and subcutaneous tissue. In: BOJRAB, M.J. (Ed.). **Pathophysiology in small animal surgery**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. p. 405.

KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: **Elsevier**; 2004. p.168-70.

KIYOZUMI, T. et al. "The effect of chitosan hydrogel containing DMEN/F12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn". **Burns**, n.33, p. 642, 2007.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, Great Yarmouth, v.26, n.3, p.219-230, 1995.

KESSLER, D. et al. Fibroblasts in mechanically stresses collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 39, p. 36575-36585, 2001.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, p. 262-270, 1981.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. 2005. Robbins e Cotran – *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7a ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro.

LAZAROV, L.; STRATIEV, S. The morphological characteristics of the cicatriz in repeat cesarean section. **Akusherstvo i ginekologiya**, Moscou, v. 32, n. 2, p.12-14, 1993.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.

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

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, n.1, p.9-18, 2007.

LIMA, A. L. R. et al. Histochemical Evaluation Of Human Prostatic Tissues With *Cratylia mollis* Seed Lectin. **Journal of Biomedicine And Biotechnology**, Volume 2010, Article ID 179817, 6 pages, 2010.

LIN, C. C.; METTERS, A. T. Metal-chelating affinity hydrogels for sustained protein release. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.83, p.954, 2007.

LORRIS, R. Principles of structures if animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p. 198-208, 2002.

LOW, Q. E. et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. **American Journal of Pathology**, v. 159, p. 457-463, 2001.

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

MACIEL, J. S. et al. Reacetylated chitosan/cashew gum gel: Preliminary study for potential utilization as drug release matrix . **Journal controlled of Applied Polymer Science**, n.99, p.326-334, 2006.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, England, v. 20, n. 20, 2005.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MENDONÇA, A.C. et al. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta ortopédica brasileira**, v.14, n.3, p.152-157, 2006.

MELO, A. F. M. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p.202-205, 2006.

MELO, C. M. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v.24, p.1631-1636, 2010.

MELO, C. M. L. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p.1631–1636, 2010a.

MELO, C. M. L. et al. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.342, p.163–169, 2010b.

MELO, C. M. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.408, p.113–119, 2011.

MELO, C. M. L. et al. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p.112-121, 2011.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R. G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. **Revista brasileira de clínica e terapêutica**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 208-213, 1985.

MONTEIRO, F. M. F. et al. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. **Process Biochemistry**, v. 42, p.884–888, 2007.

MOURA, M. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Hidrogéis Semi-IPN Baseados em Rede de Alginato-Ca²⁺ com PNIPAAm Entrelaçado: Propriedades Hidrofílicas, Morfológicas e Mecânicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n.2, p. 132-137, 2008.

MUKHERJEE, S. et al. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. **Nature**, v. 505, p. 103-107, 2014

MURTHY, N. et al. A novel strategy for encapsulation and release of proteins: Hydrogels and microgels with acid-labile acetal cross linkers. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, p.12398-12399, 2002.

MUZZARELLI, R., Chitosan, em: Muzzarelli (Ed.), **Natural chelating polymers**, Pergamon Press, Oxford, 1973, pp.144.

MUZZARELLI R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 1997;53:131–140.

NASI, A.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomics**, v.72, p.527-538, 2009.

NETO, J. C. L. **Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos** em 2003. Online. Disponível em: <<http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf>> Data de Acesso: 11 de Dez 2013.

OLIVEIRA, P. S. S. et al. Cratylia mollis 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

OLSEN, R. et al. Biomedical applications of chitin and its derivatives. In *Proceeding of the 4th International Conference on chitin and chitosan* (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen & P. Sandford, eds). **Elsevier Science Publishers**, p.813-828, 1989.

ORTONNE, J. P.; CLÉVY, J. P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. **Revue du Praticien**, Paris, v. 44, n. 13, p. 1733-1734, 1994.

OKAMOTO, Y. et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, p.49, 249, 2002.

OKAMOTO, Y. et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. . **Carbohydrate Polymers**, p.53, 337, 2003.

PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.36, p.113-118, 1992.

PANOBIANCO, M. S. et al. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v.11, p.15-22, 2012.

PELED, Z. M. et al. Response to tissue injury. **Clinics in Plastic Surgery**, USA, v. 27, p. 489-500, 2000.

PEREIRA, D. S. T. et al. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 11p, 2012.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. M. Plant lectins:specific tools for the identification, isolation, and characterization of-O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 209-258, 1998.

PEUMANS, W.J. et al. Classification of de plant lectins on families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.491, p. 27-54, 2001.

POPE, E. R. Cicatrização da pele. In: Bojrab, M. J. Técnicas Atuais em Cirurgia Veterinária de Pequenos Animais. 2.ed. São Paulo, **Manole**, p.178-183, 1996.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.53, p.321-339, 2001.

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.34, n.21, 1997.

RINI, J. M. Lectin structure. **Annual Reviews of Biophysics and Bionolecular Structure**, v. 34, p. 551-577, 1995.

RISAU, W. Angiogenic growth factors. **Progress in growth factor research**, v. 2, p. 71-79, 1990.

ROCHA JUNIOR, A. M. et al. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.81, n.2, p.150-156, 2006.

ROBBINS, S. L. **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.01-98, 2000.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE JR., D. L. Skin grafts. In: McCARTHY, J. G.; MAY JR., J. W.; LITTLER, J. W. **Plastic surgery**. v. 1, p. 221-267. Philadelphia: WB Saunders, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**. v.4, p.3198-3208, 1990.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view, **Trends in Biochemical Sciences**, v.18, p. 221-226, 1993.

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

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

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of Dermatological Science**, v.37, p.65-73, 2005.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química. Nova**, v. 29, n. 4, 776-785, 2006.

SILVA, F. O. et al. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1808-1814, 2009.

SILVA, M. C. C. et al. Immobilized Cratylia mollis lectin: An affinity matrix to purify a soybean (Glycine max) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, p.74-80, 2011.

SILVER, I. A. Basic physiology of wound healing in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 14, n. 1, p. 7-15, 1982.

SILVA, C. M. M. S. (1992) Avaliação da Camaratuba no semi-árido nordestino. Boletim de pesquisa – **EMBRAPA**. 43:22.

SILVA, C. M. M. S.; SOUZA S. M. (1986) Como produzir mudas de Camaratuba. Comunicado Técnico – **EMBRAPA**. 16:1-2.

SILVA, D. A. et al. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.16-26, 2006.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects. An update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.1047, 2001.

SINGER, A. D.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p.738-46, 1999.

SOPPIMATH, K.S. et al. Stimulus-responsive “smart” hydrogels as novel drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, p.957-974, 2002.

SUN, J. et al. Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.292-299, 2007.

SUNG, J. H. et al. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, p.232–240, 2010.

SWAIM, S. F. Wound healing. In: SWAIM, S. S. (Ed.). **Surgery of traumatized skin: management and reconstruction in the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980, p. 70.

TADA, D. et al. Albumin-crosslinked alginate hydrogeles as sustained drug release carrier. **Science & Engineering C.**, v.27, p.870-874, 2007.

TODD, R. et al. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **American Journal of Pathology**, v. 138, p. 1307-1313, 1991.

VIEIRA, C. S. C. A.; MAGALHÃES, E. S. B. ; BAJAI, H. M. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. **Caderno de reabilitação em Hanseníase**. v.2, p.52, 2002.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v.83, 2003.

WEIS, W.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v.65, p.441-473, 1996.

WILLERSON, J. T. Conversion from chronic to acute coronary heart disease syndromes. Role of platelets and platelet products. **Texas Heart Institute Journal**, v. 22, p. 13-19, 1995.

WINTER, G. D. Formation of the scab and rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, Londres, v. 193, p. 293-294, 1962.

4. Artigo científico enviado para a revista

Química Nova

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO HIDROGEL CONTENDO LECTINA DE *CRATYLIA MOLLIS*

**Rosimere Silva^{*,a}, Carina H. da Silva^a, Paloma L. de Medeiros^b, Paulo A. G. Soares^a,
Rayana A. de Paula^a, Luana C. B. B. Coelho^a, Maria H. M. Lima-Ribeiro^c, Maria G. C.
da Cunha^a, Valéria W. Teixeira^d e Maria T. S. Correia^a**

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^cLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^dDepartamento de Morfologia e Fisiologia animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

* e-mail: rosypop.bio@gmail.com

EVALUATION OF HEALING ACTIVITY IN MICE USING CONTAINING HIDROGEL LECTIN *CRATYLIA MOLLIS*

ABSTRACT

Were used 45 female mice, divided into three groups: control, hydrogel and hydrogel Cramoll 1.4. After, 2, 7 and 12 days, the animals were sacrificed. On the 2nd day, the G3 showed greater deposition of granulation tissue and intense inflammatory infiltration. The wound contraction was significant in G3, there was also a decrease in the number of erythrocytes, increased HCM and CHCM, within 12 days. Collagen deposition was significant in G3 compared to G1 on the 7th day. Our results extended the knowledge of the potential of Cramoll 1.4 in the repair of experimental skin lesions.

Keywords: Healing, Hydrogel, Cramoll 1,4.

1. Introdução

A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, quer a lesão tenha sido traumática ou necrótica¹. Tem como finalidade restabelecer a homeostasia tecidual². Consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido³⁻⁵. Clinicamente, divide-se o processo cicatricial em três fases: fase Exsudativa ou Inflamatória; fase Proliferativa ou Fibroplasia e fase de Maturação ou Contração^{6,7}. Compreender o processo cicatricial é de grande importância para a avaliação evolutiva da ferida e fundamental para um diagnóstico correto a respeito da fase em que esse processo se encontra e consequentes medidas terapêuticas que podem ser prescritas para o tratamento ideal da lesão. Dentre as macromoléculas que são testadas com finalidades terapêuticas, destacamos as lectinas, que são bastante utilizadas, devido à capacidade de participar de importantes eventos biológicos. A literatura relata que essas proteínas possuem atividade cicatrizante em lesões cutâneas experimentais.

Lectinas podem ser compreendidas como sendo proteínas (ou glicoproteínas) de origem não imunológica que se ligam reversivelmente a carboidratos, encontradas em forma livre ou ligadas a superfícies celulares por meio de sítios de ligação em sua estrutura tridimensional^{8,9}. As lectinas participam de importantes eventos biológicos tais como: recrutamento de mastócitos¹⁰, atividade antibacteriana¹¹, imunomodulatória¹², aumento da expressão de citocinas¹³, reparação tecidual de lesões cutâneas¹⁴, entre outros.

A *Cratylia mollis* Mart. (feijão camaratu) é uma planta forrageira da Região Semi-Árida do estado de Pernambuco e de suas sementes têm sido purificadas e caracterizadas, formas múltiplas de lectinas: cramoll 1, cramoll 2, cramoll 3 e cramoll 4. Uma preparação contendo as formas 1 e 4 associadas denominada Cramoll 1,4, que apresenta especificidade glicose/manose¹⁵. Estudos demonstraram que Cramoll 1,4 em solução salina promoveu em um menor tempo o efetivo fechamento e reparo de feridas quando comparado com grupo controle (solução salina)¹⁶.

A cramoll 1,4 apresenta certa estabilidade até 80 °C, ponto isoelétrico em torno de 8,6 e caráter básico. Possui ainda uma banda principal de 31 kDa e dois fragmentos da banda principal de 16 e 14 kDa. É fortemente inibida por metil α -D-manosídeo, o que entra em acordo com a classe de lectinas glicose/manose sendo similar as lectinas isoladas das leguminosas *Canavalia ensiformis* L. e *Lens culinaris* Medik^{17,18}.

Estudos relatam que os hidrogéis têm sido utilizados, na entrega de drogas e macromoléculas bioativas. A avaliação *in vivo* do hidrogel de álcool polivinílico e quitosana contendo minociclina na cicatrização de feridas demonstrou que melhorou significativamente o processo de cicatrização, quando comparado com o grupo controle, grupo tratado apenas com o hidrogel e com a droga convencional¹⁹.

Os hidrogéis são também utilizados para encapsulação e liberação de proteínas. Alguns são termosensíveis, ou seja, a liberação ocorre com mudança de temperatura. Outros são dependentes do pH, liberando a molécula ou fármaco em pH específico. Esses tipos de hidrogéis apresentam vantagens, pois é possível determinar o perfil de liberação através da mudança de temperatura ou do pH. Em um estudo avaliando a entrega de proteína, a IL-2 recombinante (rhIL-2) , *in vivo* e *in vitro*, a partir da formação de hidrogéis *in situ*, demonstrou que o efeito terapêutico de rhIL-2, foi retardado por cerca de 1-2 semanas, em comparação com a forma livre de rhIL-2, provavelmente devido a uma liberação lenta e constante de rhIL-2 a partir dos hidrogéis [20].

O uso de novas proteínas bioativas em tratamento médico depende do desenvolvimento de sistemas de entrega de droga para superar desvantagens relacionadas à estabilidade destas macromoléculas. Proteínas e peptídeos são rapidamente retirados da circulação quando administradas de modo intravenoso ou subcutâneo requerendo frequente injeção para manter níveis terapêuticos. Uma estratégia para aumentar a potência de drogas e ao mesmo tempo diminuir sua toxicidade sistêmica, é o seu encapsulamento em hidrogéis, os quais têm se mostrado excelentes ferramentas para veiculação e liberação controlada de drogas. A literatura relata a atividade cicatrizante da Cramoll 1, 4 livre, e também da quitosana e do POLICAJU, entretanto, não há relatos da associação dessa lectina com esses compostos. O hidrogel foi utilizado como veículo de entrega da proteína, justificando o estudo de cicatrização utilizando hidrogel de quitosana e POLICAJU, contendo a Cramoll 1,4.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento de lesões cutâneas experimentais em camundongos utilizando hidrogel de POLICAJU e quitosana, contendo a Cramoll 1,4.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal

Para a preparação do extrato, as sementes de *C. mollis* foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente para secagem. As sementes secas foram trituradas e, com

a farinha das sementes foi realizada uma suspensão a 10% (p/v), em NaCl 0,15 M. A extração foi efetuada por 16 h, a 4 °C, sob agitação constante e, após a extração, o material foi filtrado em gaze, em temperatura ambiente. O filtrado foi centrifugado em 12.000 x g, por 15 min, a 4 °C, obtendo-se o extrato bruto. O extrato de sementes de *C. mollis* (10% p/v em NaCl 0,15 M) foi fracionado por saturação com sulfato de amônio (40-60% p/v) e, a fração obtida foi submetida a cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. A Cramoll 1,4 biosseletivamente foi eluída com solução de D-glicose 0,3 M em NaCl 0,15 M, dialisada contra NaCl 0,15 M durante 24 h e liofilizada. A atividade hemaglutinante das frações foi determinada utilizando-se a suspensão de eritrócitos de coelho¹⁵.

2.2 Hidrogel

A preparação do hidrogel constituído de POLICAJU e quitosana, na razão de 1:4, foi realizada segundo a metodologia descrita por Soares, et al.²² As soluções estoques de 10% (p/v) de Policaju e 1% (p/v) de quitosana dissolvidos em ácido láctico a 1% (v/v), foram preparadas previamente. Em um béquer foi adicionado um volume conhecido da solução de quitosana + 200 µL de CaCl₂, e mantido sob agitação em Ultra-TURRAX (IKA) a 7000 rpm durante 20 min para a formação de um pré-gel de quitosana e logo em seguida, com o auxílio de uma seringa de calibre 27 G e um fluxo de 1 mL/min, foi sendo adicionado um volume conhecido da solução de Policaju. A mistura foi deixada sob agitação (7000 rpm) em Ultra-TURRAX durante 20 min. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 5,0 com solução de NaOH 1 M e denominada de pré-gel. O pré-gel (5mL) foi distribuído em placas de petri, onde foi adicionado 100µl/mL de Cramoll 1,4, e mantido em estufa a 40 °C durante 16 h para polimerização e secagem, o qual em seguida foi hidratado com água destilada, denominado a partir de então hidrogel, e armazenado sob-refrigeração a 4 °C.

2.3 Animais

Os camundongos Swiss albino foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em macroambiente controlado com fornecimento de *ad libitum* de água e ração. Os experimentos foram realizados obedecendo-se as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Animais Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

(23076.033699/2012-58). Um total de 45 camundongos Swiss albino fêmeas, com 2 meses de idade, pesando entre 28 a 32g, foram utilizados neste estudo.

2.4 Bioensaio

Após o procedimento anestésico, cada animal foi submetido á tricotomia do dorso e antissepsia com iodopovidona 1%. Na região dorsal do animal, foi realizada tricotomia manual e posteriormente anti-sepsia do campo operatório com iodopovidona 1 % e etanol 70%. Com o auxílio de um molde de 0,5 cm de diâmetro, a pele foi demarcada para a produção da ferida cutânea. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (n = 15), anestesiados por via intramuscular com cloridrato de xilazina 2% (10mg//kg) e cloridrato de cetamina 10% (115mg/kg). Os grupos foram assim constuídos: grupo controle (sem tratamento), grupo hidrogel (hidrogel sem lectina) e grupo hidrogel Cramoll 1,4 (hidrogel contendo Cramoll 1,4). As lesões foram observadas durante 12 dias, com aplicação de 100µL de hidrogel no grupo hidrogel e no grupo hidrogel/Cramoll 1,4, 100µL de hidrogel contendo 100µL de Cramoll 1,4. Os animais foram divididos de acordo com o tempo de avaliação: T0, T2, T7 e T12 dias [FIGURA 1].

2.5 Histopatologia

2.5.1 Parâmetros clínicos

As características clínicas das feridas experimentais foram observados todos os dia, considerando os seguintes aspectos: edema, hiperemia, secreção, sarna, granulação, crosta, reepitelização e cicatrização dos tecidos¹⁶.

2.5.2 Contração da ferida

Para o cálculo da contração da área das feridas, foi realizada a medição de suas bordas com paquímetro, no dia de biópsia, apenas no período de 12 dias, observando-se o maior e menor diâmetro. A partir desses elementos, a área foi calculada²³, $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde "A" representa a área, "R" o raio maior e "r" o raio menor da lesão. O cálculo do grau de contração foi expresso em percentual utilizando-se as equações matemáticas propostas por Ramsey et al.²⁴, $100 \times (W_0 - W_i)/W_0 = M \pm DP$, onde W_0 = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (12 dias).

2.5.3 Avaliações hematológicas

O sangue dos animais de cada grupo foi coletado e os parâmetros hematológicos (hematócrito%, eritrócitos mil/mm³, leucócitos% e plaquetas mil/mm³) foram determinados pela coleta imediata do sangue. As avaliações foram feitas em triplicata. Foi utilizado o método automatizado, para análise dos parâmetros hematológicos.

2.5.4 Histopatologia

As biópsias cutâneas foram realizadas objetivando a retirada do fragmento de pele total e área da ferida, abrangendo um centímetro além de cada margem dorsal e ventral no sentido caudal, aprofundando-se até o plano muscular. Imediatamente após a retirada da pele, as amostras foram dispostas sobre papel de filtro e fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01 M pH 7,2 por um período máximo de 48 horas, substituído por uma solução de etanol 70% (v/v). Cada fragmento de pele foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Após microtomia (5 µm de espessura), os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Para análise histoquímica foi utilizado o Tricrômico de Masson, para fibras colágenas.

2.5.5 Morfometria das fibras de colágeno

Para quantificação das fibras colágenas através das alterações em pixels, através da fotografia das lâminas coradas pelo tricrômico de masson, foi utilizado o Gimp 2.6 software (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) e os resultados contabilizados foram submetidos ao teste estatístico.

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados usando testes não-paramétricos. Todos os resultados foram expressos em valores médios dos grupos $\pm$ e analisados considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Para a comparação do teor de fibras colágenas e contração das lesões cutâneas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e quando necessário às medias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

2. Resultados e Discussão

3.1 Parâmetros clínicos

A presença de edema e hiperemia foram observadas em todos os grupos experimentais. No entanto, observou-se que no grupo hidrogel e hidrogel Cramoll 1,4, houve menor evidência de edema, com a formação de uma crosta primária, 24h após a cirurgia. Em um estudo utilizando a Cramoll 1,4 no reparo de lesões cutâneas, em camundongos saudáveis e imunocomprometidos, houve maior evidência de edema nos animais sadios, tratado com essa lectina¹⁶. Nossos resultados mostraram que essa menor evidência de edema nos grupos tratados, foi devido ao aparecimento precoce de uma crosta primária, induzida pelo hidrogel. No grupo hidrogel Cramoll 1,4 foi possível perceber maior hiperemia e a presença de exudato foi mais intensa nesse grupo. A figura 2 mostra as diferenças dos parâmetros clínicos.

O processo de cicatrização foi mais eficaz no grupo tratado com o hidrogel Cramoll 1,4, através da análise clínica, pelos seguintes aspectos: desprendimento mais rápido da crosta, sendo o processo de reepitelização mais eficiente, isso se nota pelas diferenças macroscópica da presença do tecido cicatricial e contração da ferida, como mostra a figura 2 **[FIGURA 2]**.

A formação de uma crosta mais espessa foi de suma importância nos grupos hidrogel e hidrogel Cramoll 1,4, pois permitiu um isolamento externo, prevenindo assim infecção das lesões por microrganismo e consequentemente o retardo do processo de cicatrização.

3.2 Avaliações hematológicas

Os valores obtidos não mostraram diferenças significativas para seguintes parâmetros analisados: hematócrito, leucócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos, no processo de cicatrização, nos períodos analisados. Houve uma diminuição do número de eritrócitos, aumento da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), no período de 12 dias no G3. Os valores dos parâmetros hematológicos, obtidos a partir do experimento, encontram-se na tabela 1 **[TABELA 1]**. A análise do efeito edematogênico da lectina *Dioclea violacea* (DvL), demonstrou que houve aumento de infiltração de neutrófilos²⁶. Nossos resultados demonstraram aumento do infiltrado de células inflamatórias, não especificamente de neutrófilos. No início do processo de cicatrização, há diminuição do afluxo sanguíneo pela vasoconstrição. Plaquetas são ativadas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, fazendo com que tenha início os processos de adesão e agregação celular²⁷. Já na última fase do processo de

cicatrização, que é a fase de remodelação, ocorre diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos²⁸. De acordo com Carvalho et al. (2009)²⁹, embora ratos e camundongos, entre outros mamíferos, possuam mecanismos próprios de controle dos valores dos parâmetros fisiológicos é sabido que esses animais podem apresentar variações nesses parâmetros, relacionadas com sexo, linhagem, genótipo e podem ser influenciados pela idade, pela dieta, pelo manuseio, pelo ambiente, entre outros fatores.

3.3 Contração da ferida

A contração foi observada em todos os grupos experimentais. Entretanto, no grupo hidrogel Cramoll 1,4 houve maior taxa percentual de contração, como mostra a figura 3, sendo isso mais uma evidência de eficácia do processo de cicatrização nesse grupo experimental **[FIGURA 3]**. Estudos analisando o perfil de proteases em lesões cutâneas experimentais, tratados com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias das feridas dos grupos ConBr e os demais grupos analisados na fase de fibroplasia, sugerindo que a ConBr, quando aplicada topicamente, promove a ativação de células envolvidas no processo cicatricial, favorecendo a evolução do mesmo²⁵.

3.4 Histopatologia

No grupo controle, com dois dias, foi possível observar presença de crosta constituída de plasma e restos celulares ocupando toda a área da lesão. Intenso infiltrado inflamatório e formação inicial de tecido de granulação. Em função da perda tecidual, denota-se uma proximidade com a região hipodérmica com efetiva presença de células adiposas. No período de dois dias, tanto os animais tratados com hidrogel e com hidrogel contendo Cramoll 1,4, apresentaram extensa crosta recobrando a área da lesão, intenso infiltrado inflamatório, e vasta vascularização. Foi expressiva a formação de tecido de granulação nos animais tratados com hidrogel contendo a Cramoll 1,4, quando comparados àqueles tratados com hidrogel e aos do grupo controle no referido tempo de observação. A figura 4 mostra o intenso infiltrado inflamatório e deposição do tecido de granulação. No período de sete dias após cirurgia, observa-se ainda presença de crosta, porém de forma discreta, amadurecimento do tecido de granulação com nítida vascularização e deposição de colágeno. E aos doze dias, denota-se uma reorganização da matriz extracelular com considerável deposição de colágeno e

desaparecimento de alguns vasos sanguíneos. Neste período, também, percebe-se a reepitelização do tecido [FIGURA 4].

Aos sete dias do pós-operatório foram observados, em ambos os grupos de animais tratados, crostas, vascularização ativada, discreta proliferação de fibroblastos e estabelecimento de forma incompleta do processo de reepitelização.

No período de 12 dias, verificou-se a reepitelização completa em todos os grupos pós-cirurgia, chamando atenção a caracterização de papilas dérmicas nos animais tratados com hidrogel e hidrogel Cramoll 1,4, sendo mais expressiva a presença de papilas no grupo tratado apenas com hidrogel. A figura 5 mostra o processo de reepitelização [FIGURA 5]. Os achados revelam ainda uma maior organização da matriz extracelular com moderada presença de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. A presença de papilas dérmicas é de suma importância, pois na ausência de papilas, há formação de um tecido frágil entre o epitélio e tecido cicatricial, podendo ocorrer lesões com perda tecidual, se houver pequenas agressões.

A literatura relata que a quitosana e o policaaju aceleram o processo de cicatrização. O fato da quitosana ser alvo de ataque da lisozima e da NAGase gerando, ao final do processo de despolimerização, *N*-acetilglicosamina e glicosamina, dois açúcares envolvidos na reepitelização, explica a propriedade biodegradável desse polímero. Essa característica, associada à baixa toxicidade, faz da quitosana polímero biocompatível²⁷. A utilização do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L.(Policaaju) na fase inflamatória de lesões cutâneas, demonstrou que o policaaju favorece a resolução do período inflamatório, considerando as características de sinais flogísticos menos intensos e a presença de tecido de granulação fibrovascular e fibras colágenas³⁰.

O infiltrado inflamatório foi percebido em todos os grupos de animais (controle e tratados), sendo mais intenso nos animais tratados com hidrogel com Cramoll 1,4, no período de 2 e 12 dias, quando comparados aos demais, como mostra a figura 5. Em um estudo avaliando o efeito edematogênico da lecitina *Dioclea violacea* (DvL), ligadora de glicose-manose, demonstrou-se que a mesma induz edema, aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos. A atividade edematogênica envolve os sítios de ligação da lectina de manose é associada com a histamina, citocinas e óxido nítrico, uma vez que poderiam ser tratadas com meclizina, dexametasona e N- nitro - L - arginina cloridrato do éster metílico (L -NAME)²⁶.

3.5 Morfometria das fibras de colágeno

Não houve diferenças entre os grupos no 2º dia, como mostra a figura 6. Verificaram-se diferenças significativas no G3 em relação ao G1 no 7º dia, como mostra a figura 7 e, uma redução significativa no G1, em relação ao G2 e G3 no 12º dia, como mostra a figura 8 [FIGURAS 6, 7 e 8]. A utilização de policaju na fase inflamatória de lesões cutâneas demonstrou que a deposição de colágeno foi menos intensa em relação ao grupo controle³⁰. A avaliação da Cramoll 1,4 no reparo de lesões cutâneas, em camundongos saudáveis e imunocomprometidos, constatou-se que no grupo tratado apenas com a Cramoll 1,4, houve um excelente reparo em relação à deposição de colágeno, tanto para os animais sadios como também para os imunodeprimidos¹⁶. De acordo com os nossos resultados, os grupos G2 e G3, apresentaram um percentual maior de fibras colágenas, no período de 12 dias, demonstrando que o hidrogel de POLICAJU e quitosana foi mais efetivo no processo de deposição das fibras de colágeno.

3. Conclusão

Nossos resultados demonstraram que a Cramoll 1,4 intensificou o processo inflamatório, promovendo a contração mais efetiva das lesões e maior deposição do tecido de granulação, demonstrando que a Cramol 1,4 associada ao hidrogel de quitosana e ao policaju foi eficaz no processo cicatricial, ampliando assim o conhecimento do potencial da Cramoll 1,4 no reparo de lesões cutâneas experimentais.

4. Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Ciência e a Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

5. Referências

- [1] Panobianco, M. S.; Sampaio, B. A. L.; Caetano, E. A.; Inocenti, A.; e Gozzo, T. O.; *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste*, **2012**,11,15-22.
- [2] Cavalcante, L. C.; Moreira, M. C.; Mota, O. M. L.; Turatti, E.; Viana, F. A. C.; Pereira, S. L. S.; *Journal Brazilian Periodontol*, **2012**, 22,1, 69-73.
- [3] Ortonne, J. P.; Clévy, J. P.; *Revue Du Praticien*, **1994**, 44, 13,1733-1734.
- [4] Gilltzer, R.; Goebeler, M.; *Journal of Leukocyte Biology*, **2001**, 69, 4, 513-521.
- [5] P. Martin, S. J. Leibovich, *Trends in Cell Biology*, **2005**, 20, 20.

- [6] Robbins, S. L.; “*Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional*”, 5.ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- [7] Jorge, S. A.; Dantas, S. R. P. E.; “*Abordagem Multiprofissional do Tratamento de feridas*”, Editora Atheneu: São Paulo, 2003.
- [8] Ghosh, S.; Manjumder, S. Manjumder, N. Ganguly, B. P.; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1999**, 371, 163-168.
- [9] Sun, J.; Wang, L.; Wang, B.; Guo, Z.; Liu, M.; Jiang, K.; Luo, Z.; *Fish & Shellfish Immunology*, **2007**, 23, 292-299.
- [10] Buranello, P. A. A.; Moulin, M. R. I.; Souza, D. A. Jr.; Jamur, M. C.; Roque-Barreira, M. C.; Oliver, C.; **2010**, *PLoS ONE* 5, 5.
- [11] Mukherjee, S.; Zheng, H.; Derebe, M. G.; Callenberg, K. M.; Partch, C. L.; Rollins, D.; Propheter, D. C.; Rizo, J.; Grabe, M.; JIANG, Q.; HOOPER, L. V.; *Nature*, **2014**, 505, 103-107.
- [12] Melo, C. M. L.; Castro, M. C. A. B.; Oliveira, A. P.; Gomes, F. O. S.; Pereira, V. R. A.; Correia, M. T. S.; Coelho, C. B. B.; Paiva, P. M. G.; *Phytotherapy Research*, **2010**, 24, 1631–1636.
- [13] Melo, C. M. L.; Paim, B. A.; Zecchin, K. G.; Morari, J.; Chiaratti, M. R.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G.; *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2010**, 342,163–169.
- [14] Pereira, D. S. T.; Lima-Ribeiro, M. H. M.; Santos-Oliveira, R.; Cavalcanti; C. L. B.; Pontes-Filho, N. T.; Coelho, L. C. B. B.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Correia, M. T. S.; *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**, 11, 2012.
- [15] Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1995**, 55, 261-273.
- [16] Melo, C. M.; Porto, C. M.; Melo-Júnior, M. R.; Mendes, C. M.; Cavalcanti, C. C. B.; Coelho, L. C. B. B.; Porto, A. L. F.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Correia, M. T. S.; *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**, 408, 113–119.
- [17] Lima, V. L. M.; Correia, M. T. S.; Cechinel, Y M. N.; Sampaio, C. A. M.; Owenand, J. S.; L. Coelho, C. B. B.; *Carbohydrate Polymers*, **1997**, 33, 27-32.
- [18] Hong, M.; Cassely, A.; Mechref, Y.; Novotny, M.V.; *Journal of Chromatography*, 2001, 752, 207-216.
- [19] Sung, J. H.; Hwang, M.; Kim, J. O.; Lee, J. H.; Kim, Y. I.; Kim, J. H.; Chang, S. W.; JIN, S. G.; Kim, J. A.; Lyoo, W. S.; Han, S. S.; Ku, S. K.; Yong, C. S.; Choi, H.; *International Journal of Pharmaceutics*, **2010**, 392, 232–240.

- [20] Hiemstra, C.; Zhong, Z.; Jomme, S. R.; Steenbergen, M. J.; Jacobs, J. J.; Otter, W. A.; Hennink, W. E.; Feijen, J.; *Journal of Controlled Release*, **2007**, 119, 320-327.
- [21] Soares, P. A. G.; Andrade, C. A. S.; Pessoa-Jr, A.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Foz do Iguaçu, Brasil, **2012**.
- [22] Prata, M.; Haddad, C.; Goldenberg, S.; Simoes, M. J.; Moura, L. A. R.; Trabulsi, L. R.; *Acta Cirúrgica Brasileira*, **1998**, 3, 2, 43-48.
- [23] Ramsey, D.; Pope, E.; Wagner-Mann, C.; Berg, J. N.; Swaim, S. F.; *American Journal Veterinary Research*, **1995**, 56, 941-949.
- [24] Silva, F. O.; Araujo, R. V. S.; Schirato, G. V.; Teixeira, E. H.; Junior, M. R. M.; Cavada, B. S.; Lima-Filho, J. L.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Porto, A. L. F., *Ciência Rural*, **2009**, 39, 6, 1808-1814.
- [25] Alencar, N. M. N.; Mota, M. R. L.; Rodrigues, N. V. F. C.; Martins, J. L.; Nascimento, K. S.; Assreuy, A. M. S.; Cavada, B. S.; *Pharmacological Reports*, **2013**, 65, 220-225.
- [26] LI, J.; J.; KIRSNER, R.; *Clinics in Dermatology*, **2007**, 25, 1, 9-18.
- [27] Silva, H. S. R. C.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I.; *Química Nova*, **2006**, 29, 4, 776-785.
- [28] Vieira, C. S. C. A.; Magalhães, E. S. B.; Bajai, H. M.; *Caderno de reabilitação em Hanseníase*, 2002, 2, 52.
- [29] Carvalho, G. D.; Masseno, A. P. B.; Zanini, M. S.; Zanini, S. F.; Porfirio, L. C.; Machado, J. P.; Mauad, H.; *Ceres*, **2009**, 56, 1, 51-57.
- [30] Schirato, G. V.; Monteiro, F. M. S.; Silva, F. O.; Filho, J. L. L.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Porto, A. L. F.; *Ciência Rural*, **2006**, 36, 1, 149-154.

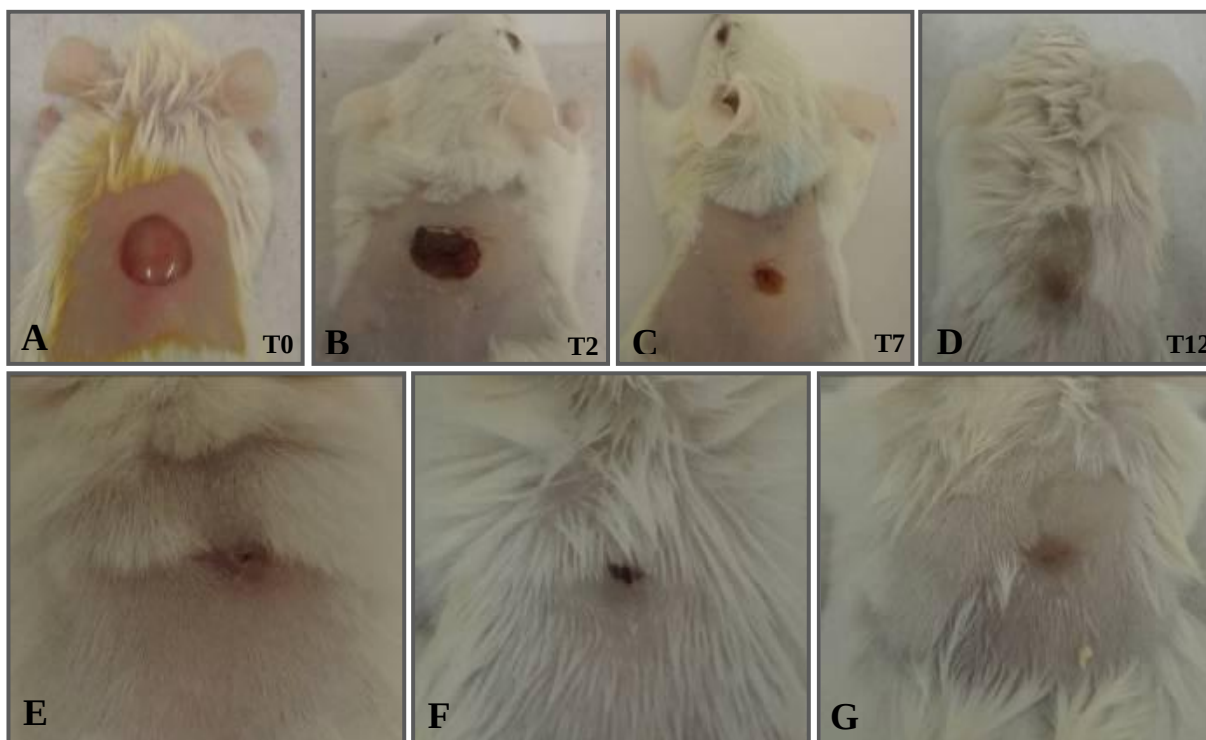


Figura 1: A - D: Produção de feridas cutâneas experimentais. T0 - feridas cirúrgicas experimentais. A ferida foi feita através de um molde de 0,5 cm de diâmetro; T2 - Presença da crosta; T7 - formação de tecido cicatricial e T12 - cicatriz. As imagens são representativas dos animais de G3. E - G: Avaliação macroscópica do tecido da cicatriz e contração das lesões cutâneas em grupos experimentais após doze dias de tratamento. E - G1, F e G - G2, G3, respectivamente. A área de contração foi medida usando um paquímetro

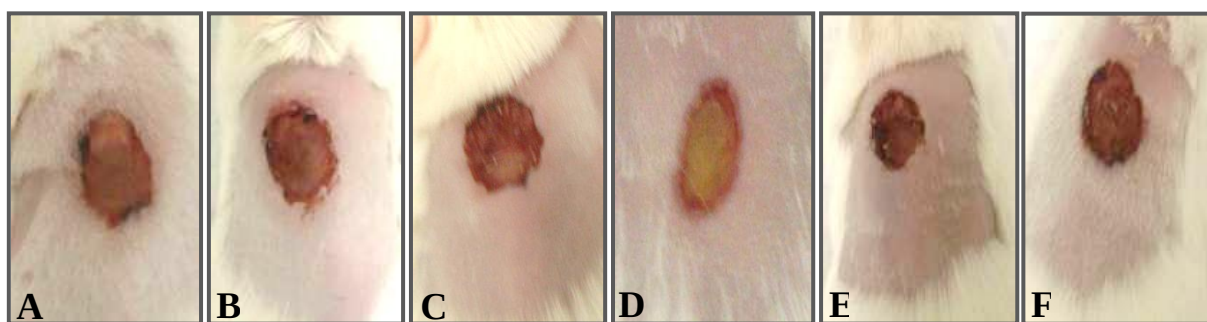


Figura 2: Observação de parâmetros clínicos. A - C: Análise clínica 24 horas após o procedimento cirúrgico. Notar edema e hiperemia no A - G1, B e C - G2 e G3, respectivamente. Nota maior hiperemia, e menor evidência de edema no G3. D - F: Análise da formação de crosta no 7º dia. D - G1, E - G2 e F - G3. Notar crosta mais espessa no G2 e G

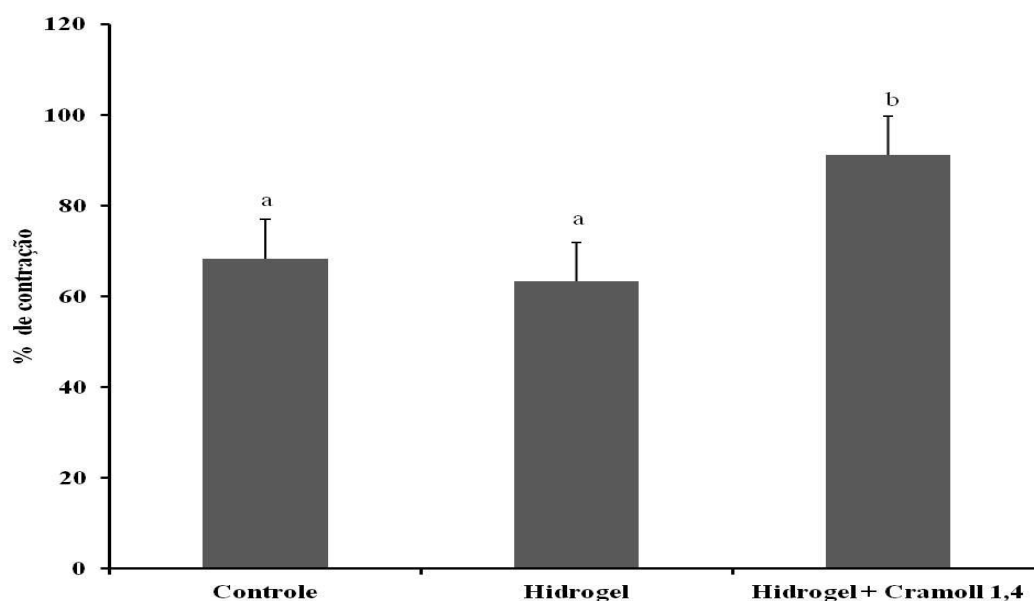


Figure 3: Percentual de contração das feridas após doze dias de tratamento. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P=0,0077$)

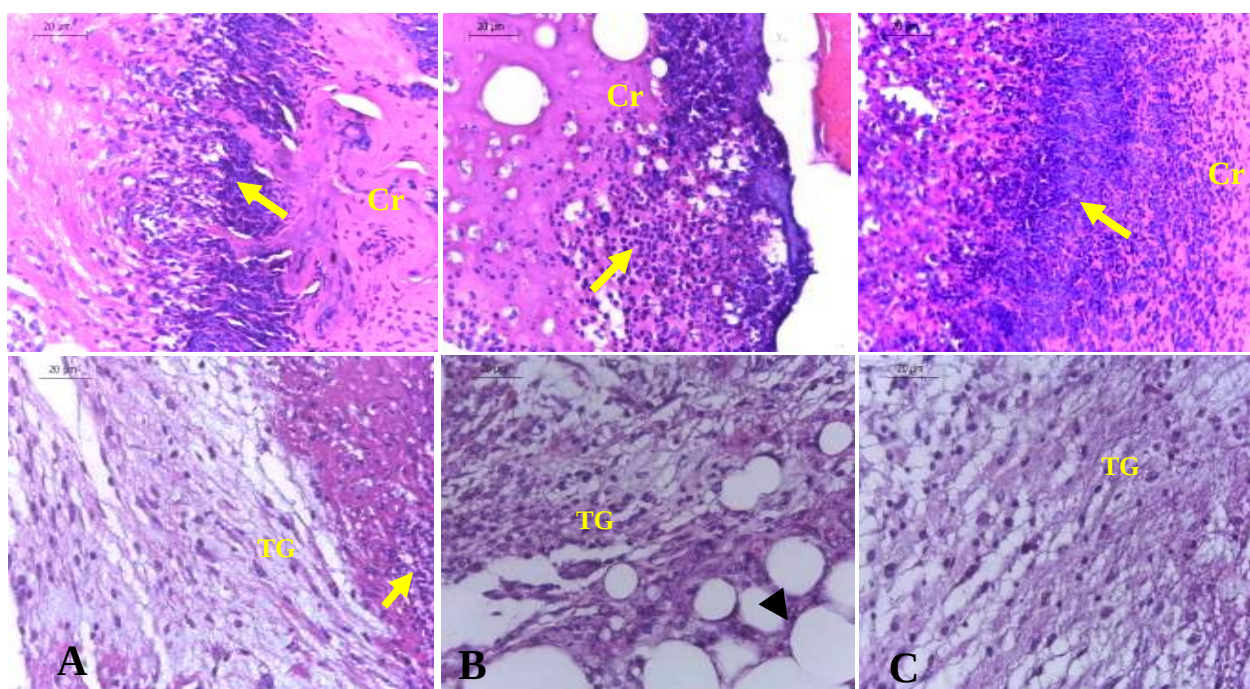


Figura 4: Presença de infiltrado inflamatório nas lesões cutâneas após dois dias de tratamento. A - controle, B – Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Observe a presença de infiltrado inflamatório mais intenso no grupo hidrogel/cramoll 1, 4. A - controle, B – Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Notar maior intensidade de tecido de granulação no grupo hidrogel/Cramoll 1.4. Coloração H.E. Barra de escala: 20μm. Seta longa - infiltrado inflamatório; Cr – Crosta; TG - tecido de granulação; setas longas - infiltrado inflamatório; ponta de de seta – adipócitos

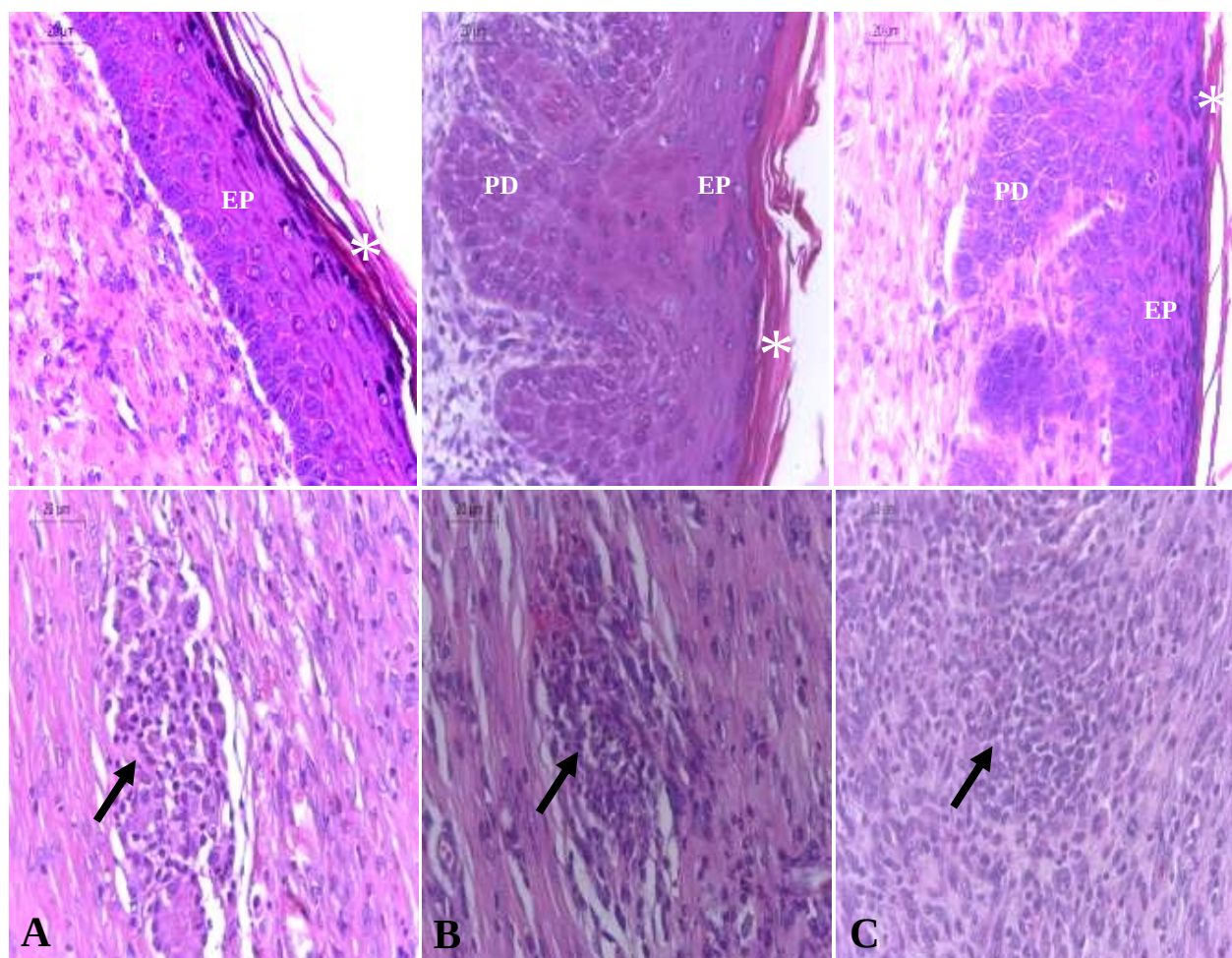


Figura 5: Processo de reepitelização e infiltrado das feridas experimentais após doze dias de tratamento. A - Controle, B - Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Notar a presença de papilas dérmicas nos grupos hidrogel e hidrogel/Cramoll 1,4. A - Controle, B – Hidrogel e C - Hidrogel/Cramoll 1.4. Observar a presença de infiltrado inflamatório mais intensa no hidrogel/cramoll1, 4 grupo. Coloração H.E. Barra de escala: 20 μ m. EP. – Epitélio; PD - papilas dérmicas; Asterisco – Queratina; Seta longa - infiltrado inflamatório

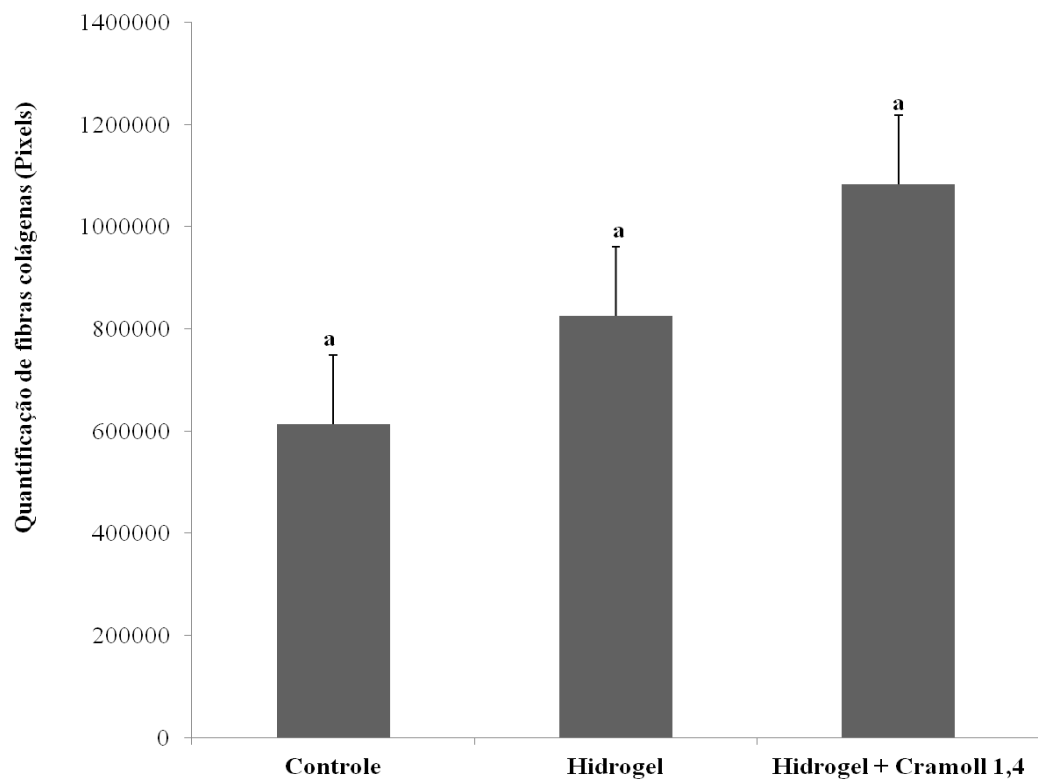


Figure 6: Quantificação das fibras de colágeno, após dois dias de tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P = 0.1639$)

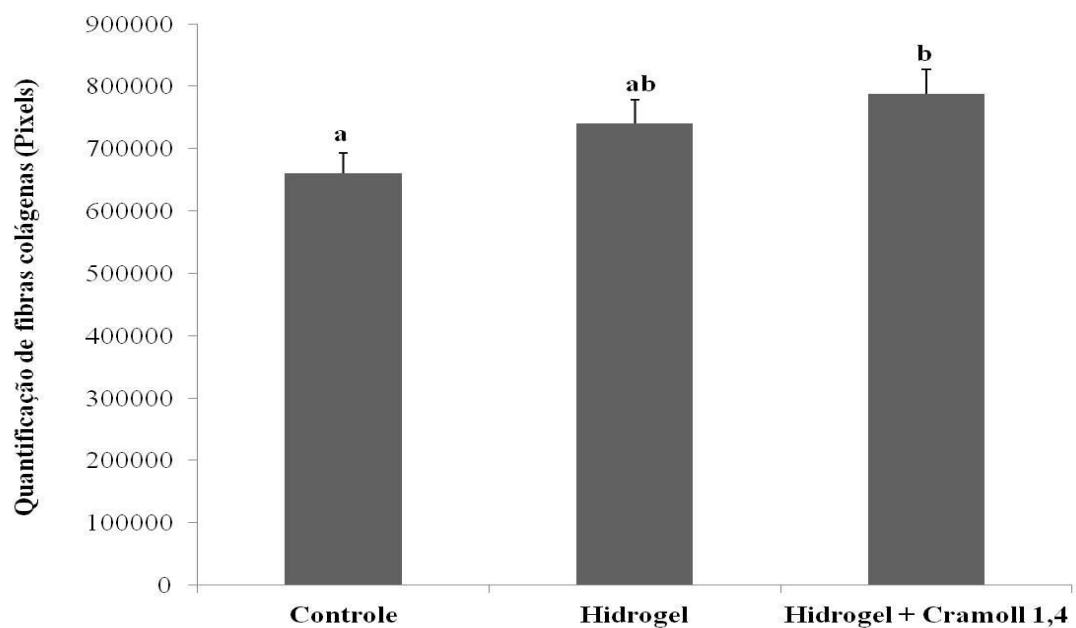


Figure 7: Quantificação das fibras de colágeno, após sete dias de tratamento. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P = 0.0137$)

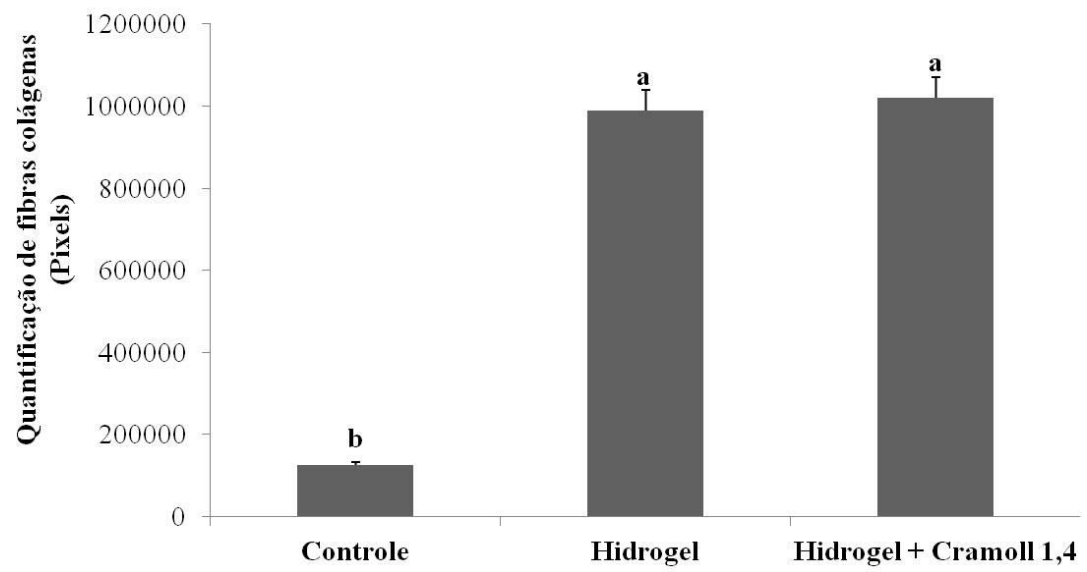


Figure 8: Quantificação das fibras de colágeno após 12 dias de tratamento. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P = 0.0057$)

5. ANEXOS

NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA

REVISTA QUÍMICA NOVA

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico (clique [aqui](#) para acessar as normas de restrição). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida e lista de publicações, acompanhados de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

ANTES DA SUBMISSÃO

Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será

publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção Introdução deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele.

A seção Parte Experimental pode preceder ou vir após a seção Resultados e Discussão, mas devem ser necessariamente separadas. A seção Conclusões, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção Resultados e Discussão.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser incluídas no Material Suplementar (ver seção Material Suplementar).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas por e-mail à Editoria da Química Nova. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os manuscritos em língua inglesa que forem considerados para avaliação deverão, no envio da versão revisada, portar certificado de correção de idioma emitido por empresa especializada. O certificado deve ser enviado por e-mail para sbqedit@sbq.org.br.

Os Editores poderão solicitar o certificado a qualquer momento do processo de avaliação caso julguem necessário. Dessa forma, os autores interessados em submeter manuscritos em língua inglesa devem estar cientes dessa possibilidade.

Preparo dos manuscritos

Geral

Um modelo de artigo (.doc) já formatado de acordo com as normas da Química Nova pode ser obtido [aqui](#).

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5x. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

Os elementos gráficos, tabelas e suas respectivas legendas devem vir ao final do artigo. Deve-se indicar, no texto, onde o elemento deve aparecer após a diagramação, utilizando as *tags* entre colchetes. Esses elementos devem aparecer o mais próximo possível de onde foram citados pela primeira vez.

Alguns exemplos:

(...) A Figura 1 mostra o sistema utilizado na primeira etapa do processo.

[FIGURA 1]

Os valores obtidos a partir do experimento encontram-se na Tabela 1.

[TABELA 1]

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o graphical abstract (ver seção Graphical Abstract), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{*,a}

^a Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^b Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida a faculdade/instituto e, por fim, a universidade. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 150 (cento e cinquenta) palavras, e a indicação de 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.

Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico. Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli* ...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

- As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-).

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: as fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O graphical abstract deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [**os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões**]. Junto com o graphical abstract, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As referências devem ser citadas na forma de números sobrescritos após a pontuação, quando houver. Parênteses e colchetes não devem ser utilizados. Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

Alguns exemplos:

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide *et al.*,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>).

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar *doi* da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**.(CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3,**1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito, ao final do arquivo .pdf.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas. Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão on line, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS. Assim como as Figuras e Tabelas, devem ser numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

DURANTE A SUBMISSÃO

A QN oferece aos autores a submissão on line, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente a partir do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Para as versões de avaliação

Deve ser gerado um arquivo único, em formato PDF, preparado de acordo com as normas descritas anteriormente. O sistema online de submissão da Química Nova não aceitará outro formato de arquivo para as versões de avaliação.

Manuscritos Revisados: Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o

sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada. Deve ser redigida uma carta de encaminhamento, em pdf, aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados por meio da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão online da revista.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Para a versão final

Quando for solicitado o envio da versão final, os autores deverão enviar a versão redigida em arquivo .doc/.docx, de acordo com as normas descritas anteriormente. Os elementos gráficos e as tabelas devem ser enviados separadamente, em seus formatos originais:

Estruturas químicas: *.cdx (ChemDraw, ISIS-Draw e correlatos)

Gráficos: *.opj/org (Origin) ou *.xls/xlsx (Excel)

Tabelas: *.doc (Word) ou *.xls/xlsx (Excel)

Outros elementos (Figuras, esquemas, etc.): *.cdr (CorelDraw)

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho poderá ser atestada por consultor(es) *ad hoc*, indicados pela Editoria.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.