

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

ISABEL RENATA DE SOUZA ARRUDA

IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM MEMBRANAS
POLISSACARÍDICAS E SUA APLICAÇÃO COMO
CURATIVO TÓPICO

Recife
2014

ISABEL RENATA DE SOUZA ARRUDA

IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM MEMBRANAS
POLISSACARÍDICAS E SUA APLICAÇÃO COMO
CURATIVO TÓPICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, área de concentração de
Biotecnologia

Orientadores:

Prof. Dr. António Augusto Martins de O. S. Vicente;

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha;

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2014

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

Arruda, Isabel Renata de Souza

Imobilização de lectinas em membranas polissacarídicas e sua aplicação como curativo tópico / Isabel Renata de Souza Arruda. – Recife: O Autor, 2014.

131 folhas: il.

Orientadores: Antônio Augusto Martins de O. S. Vicente, Maria das Graças Carneiro da Cunha, Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia

1. Polissacarídeos 2. Cicatrização de ferimentos I. Vicente, Antônio Augusto Martins de O. S. (orient.) II. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (coorient.) III. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient) IV. Título.

572.566

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-255

IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM MEMBRANAS POLISSACARÍDICAS E SUA APLICAÇÃO COMO CURATIVO TÓPICO

Isabel Renata de Souza Arruda

Comissão Examinadora

Prof. Dr. António Augusto Martins De O. S. Vicente
(Orientador) – Universidade do Minho – UMINHO – Braga/Portugal

Prof^a. Dra. Carolina de Albuquerque Lima
(Membro Externo) – Universidade de Pernambuco – UPE

Dra. Maria Helena Madruga Lima Ribeiro
(Membro Externo) – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA – UFPE

Prof^a. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
(Membro Interno) – Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
(Membro Interno) – Departamento de Bioquímica – UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos,
a minha “*vida*” Heloiza e ao meu noivo Junior.
Por eles eu tenho o maior amor do mundo!

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida. O Senhor sim é verdadeiramente responsável por todas as minhas vitórias.

Ao meu orientador, professor António Vicente, pela imensa confiança, mesmo tão distante sempre me deu apoio e incentivo. Agradeço especialmente ao professor António Vicente por ter me aceitado como aluna de doutorado mesmo sem me conhecer. Espero ter correspondido ao menos um pouco as suas expectativas.

As minhas co-orientadoras Prof^a. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha e Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela orientação, oportunidade, confiança, simpatia, respeito, profissionalismo e paciência em todos os momentos.

À minha parceira de todas as horas Prof^a. Dra Márcia Vanusa, por quem tenho profunda admiração pelo exemplo de ser humano que a senhora é!

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento profissional.

Aos colegas do curso do doutorado em Ciências Biológicas pela amizade e apoio durante todo o curso.

Aos amigos Adelmo Aragão Neto, Alexandre Gomes Silva, Antônio Fernando Vaz, Carolina Malafaia, Clébia Almeida, Marthyna P. Souza, Paulo Antonio Soares, Priscilla B. S. Albuquerque, Romero Brandão Costa e Túlio Diego pela companhia, atenção e disponibilidade durante todo desenvolvimento deste trabalho. Foi um prazer trabalhar com vocês. Espero ainda ter muitos anos de convivência.

Aos colegas de departamento sem as trocas de reagentes e informações entre os laboratórios da bioquímica a realização desse trabalho não seria possível.

À minha amada e querida família, pela inquestionável dedicação e apoio as minhas escolhas. Vocês são o que tenho de mais valioso, o meu porto seguro; Amo muito a todos.

A todas as colaborações com as instituições de pesquisa; Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Universidade do Minho, Universidade Federal de Alagoas e Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas e amigos que de alguma forma me apoiaram e contribuíram na realização e conclusão desse trabalho.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar a onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.” (Bill Gates).

RESUMO

Xiloglucanas são polissacarídeos solúveis em água, não tóxicos, os quais podem formar soluções altamente viscosas a baixas concentrações e em associação com outros polissacarídeos formam géis que controlam a estrutura e a textura de muitos produtos comerciais. A xiloglucana presente nas sementes de *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*, uma árvore brasileira pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpiniaceae, popularmente conhecido por Jatobá, tem sido estudadas para a produção de membranas com aplicação biotecnológica. O presente trabalho teve por objetivo a extração e caracterização da xiloglucana contida nas sementes de *H.courbaril*, produção e caracterização de membranas deste polissacarídeo contendo a lectina concanavalina A (ConA) incorporada e avaliação do efeito no tratamento tópico utilizando as membranas frente a lesões cutâneas experimentais em camundongos. Os rendimentos de extração da xiloglucana apresentaram resultados de $71,71\% \pm 5$ e $81,05\% \pm 7$. A caracterização estrutural e reológica confirmou uma estrutura amorfa com picos característicos do respectivo polissacarídeo, enquanto que a composição monossacarídica realizada por GC/MS mostrou uma relação de glicose:xilose:galactose:arabinose (40:34:20:6). Os espectros de RMN confirmaram a estrutura central da xiloglucana composta por unidades de glicose parcialmente ramificadas com unidades terminais de xilose e galactose. As membranas de xiloglucana com ConA incorporada foram eficientemente produzidas, não apresentando toxicidade e mantendo-se estáveis por aproximadamente 40 dias. A interação entre lectina e polissacarídeo foi confirmada através do pico característico no FTIR. As microscopias de transmissão e fluorescência confirmaram a boa distribuição morfológica das membranas, enquanto os perfis das propriedades mecânicas mostraram que a incorporação da lectina aumentou a resistência do mesmo e não alterou as características de cor e permeabilidade aos gases. Uma vez caracterizado, As membranas foram aplicadas em feridas cutâneas experimentais em camundongos BALB/C e a avaliação histopatológica ocorreu durante um período de 0-16 dias. As amostras foram divididas em 3 grupos: Membranas de xiloglucana-ConA (MXC), Membranas de xiloglucana (MX) e solução salina (controle negativo). MXC apresentou sinais inflamatórios como edema e hiperemia estatisticamente menos intensos quando comparados a MX e o controle negativo. A análise histopatológica confirmou a completa reepitelização do tecido tratado com a presença de fibras colágenas localizados no tecido fibroso de granulação nos dias 10, 13 e 14, respectivamente para MXC, MX e controle negativo. Devido à eficácia e ao menor tempo de cicatrização de MXC, podemos concluir que a membrana de xiloglucana com ConA incorporada pode ser utilizada em processos de reparação nas lesões cutâneas.

Palavras-chave: Xiloglucana; *Hymenaea courbaril*; Membranas; Cicatrização.

ABSTRACT

Xyloglucans are water soluble polysaccharides, non toxics, which can form highly viscous solutions at low concentrations and in association with other polysaccharides, they form gels that control the structure and the texture of many commercial products. The xyloglucan present in the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*, a Brazilian tree belonging to the family Fabaceae and Caesalpinaceae subfamily, popularly known as Jatoba, was efficiently extracted and used for the production of membranes with biotechnological applications. The present study aimed the extraction and characterization of xyloglucan contained in the seeds of *H. courbaril*, production and characterization of this polysaccharide membranes containing the lectin concanavalin A (ConA) incorporated and evaluation of the effect in the topical treatment using membranes against wound healing on experimental mice. The xyloglucan extraction yields results showed $71.71\% \pm 5$ and $81.05\% \pm 7$. The rheological and structural xyloglucan characterization confirmed an amorphous structure with characteristic peaks of the corresponding polysaccharide, while the monosaccharide composition performed by GC/MS showed a relationship of Glucose:Xylose:Galactose:Arabinose (40:34:20:6). NMR spectra confirmed the central backbone of the polysaccharide composed by glucose units partially branched with non-reducing terminal units of xylose and galactose. Xyloglucan membranes incorporated with ConA were efficiently produced, showing no toxicity and remained stable for approximately 40 days. The interaction between lectin and polysaccharide was confirmed by the characteristic peak in FTIR. The transmission and fluorescence microscopy confirmed a well-distribution morphological of the membranes, while the profiles of mechanical properties showed that the lectin incorporation increased the resistance and did not alter the characteristics of color and permeability to gases. Once a time characterized, the membranes were applied in experimental wound healing in BALB/C mice and the histopathology evaluation was done during a period of 0-16 days. The samples were divided into 3 groups: xyloglucan-ConA membranes (XCM), xyloglucan membranes (XM) and saline (negative control). XCM showed inflammatory signs such as edema and hyperemia statistically less intense when compared to XM and the negative control. Histopathological analysis confirmed complete reepithelialization of the treated fabric with the presence of collagen fibers located in the fibrous granulation tissue on days 10, 13 and 14 respectively for XCM, XM and negative control. Due to the effectiveness and shorter healing XCM, we can conclude that the membranes xyloglucan with built-Con can be used in repair processes in skin lesions.

Keywords: Xyloglucan; *Hymenaea courbaril*; Membranes; Healing.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	Árvore (A), Flores (B) e Fruto com sementes de <i>H. courbaril</i> var. <i>courbaril</i> (C e D).....	16
Figura 2	O polissacarídeo xiloglucano na estrutura da parede celular vegetal.....	17
Figura 3	Segmento representativo de uma cadeia de xiloglucana de origem vegetal.....	18
Figura 4	Estrutura química das unidades de ramificação da xiloglucana.....	19
Figura 5	Esquema de uma lesão cutânea.....	34
Figura 6	Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas.....	36
Figura 7	Fases ordenadas da cicatrização de feridas, em função do tempo.....	38
Figura 8	Análise do fechamento de ferida. Fotografias padronizadas da evolução do processo de reparação tissular.....	39

ARTIGOS

CAPÍTULO 1

Figure 1	X-rays patterns of the xyloglucan obtained from <i>H. courbaril</i> seeds.....	71
Figure 2	FTIR spectra of the xyloglucan extracted from <i>H. courbaril</i> seeds.....	72
Figure 3	Gas chromatography of the methylated derivatives obtained from the xyloglucan from <i>H. courbaril</i> seeds.....	74
Figure 4	One-dimensional (1D) ^1H -NMR spectra of the xyloglucan from <i>H. courbaril</i> seeds. In the spectrum ^{13}C - ^1H HSQC shown the signals of CH carbon/proton are in blue (phase signals) and those from CH_2 in green (antiphase).....	76
Figure 5	Two-dimensional (2D) ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^1H TOCSY spectra of the xyloglucan from <i>H. courbaril</i> seeds. where Xyl' and Xyl represents xylose-substituted and xylose-unsubstituted, respectively.....	77
Figure 6	Rheological analysis of the solutions obtained from the xyloglucan of the <i>H. courbaril</i> seeds at 0.5 (ball symbols) and 1.0% (square symbols) [w/v]. (A) rotational flow studies of apparent viscosity as a function of shear-rate, (B) oscillatory studies measuring G' (filled symbols) and G'' (open symbols) as a function of frequency and (C) stress-strain experiment measuring G' and G'' as a function of shear stress.....	81

CAPÍTULO 2

Figure 1	Infrared-ATR spectra of xyloglucan membranes incorporated with ConA (black) and a xyloglucan membranes (red).....	101
Figure 2	Fluorescence microscopy and transmission electron microscopy images. Xyloglucan membranes (A), xyloglucan membranes with the ConA-FITC (B) and xyloglucan membranes with the ConA-Au (C, D).....	103
Figure 3	Monitoring of the bioactivity.....	106
Figure 4	Graphical representation of ConA liberation from xyloglucan-ConA membranes, protein concentration in mg/mL versus time in hour.....	106
Figure 5	Stability of the xyloglucan-ConA membranes (XCM) and ConA solution (positive control) at temperatures of 4 °C and 30 °C.....	107

CAPÍTULO 3

Figura 1	Variação com o tempo dos sinais clínicos e área da lesão, após o tratamento tópico com os grupos (C) NaCl 0,15M, (MX) membrana de xiloglucana e (MXC) membrana de xiloglucana com ConA.....	120
Figura 2	Evolução temporal macroscópica das áreas das lesões dos grupos tratados com (C) NaCl 0,15M, (MX) membrana de xiloglucana e (MXC) membrana de xiloglucana com ConA.....	120
Figura 3	Fotomicrografia das lesões cirúrgicas na pele de camundongos tratados com os grupos (C) NaCl 0,15M, (MX) membrana de xiloglucana e (MXC) membrana de xiloglucana com ConA. (TM) 100 x e (TM) 400x corado com tricrômio de masson, com aumento de 100 e 400 vezes, respectivamente. Observações das lâminas: c, crosta; i, infiltrado inflamatório; at, área de transição; a, angiogênese; r, reepitelização; fv, tecido granulação fibrovascular; ep, epiderme; seta, fibroblastos e asterisco, fibras colágenas.....	122
Figura 4	Perfil de citocinas identificadas no soro dos animais tratados com os grupos C, MX e MXC pelo um período de 14 dias.....	123
Figura 5	Gel representativo do proteoma sérico de animais tratados com os grupos C, MX e MXC. As setas indicam proteínas diferencialmente expressas entre os grupos e os tempos analisados.....	125

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1	Origem e aplicações de xiloglucana extraído de diversas fontes.....	21
-----------------	---	----

ARTIGOS

CAPÍTULO 1

Table 1	Comparison of the monosaccharide composition of the xyloglucan from <i>H. courbaril</i> seeds by GCMS of derived alditol acetates.....	73
Table 2	Retention time and the proportion of the methylated derivatives obtained from the xyloglucan from <i>H. courbaril</i> seeds.....	75
Table 3	^1H and ^{13}C Proton chemical shifts of the xyloglucan from <i>H. courbaril</i> seeds...	78

CAPÍTULO 2

Table 1	Thickness, permeability and mechanical properties values of xyloglucan and xyloglucan-ConA membranes.....	104
Table 2	Colour and opacity values of xyloglucan and xyloglucan-ConA membranes...	105

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Identificação das proteínas séricas de camundongos tratados com os grupos C, MX e MXC com expressão diferencial identificada.....	124
-----------------	---	-----

SUMÁRIO

Págs.

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. Introdução	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Revisão de literatura	15
3.1 <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	15
3.2 Polissacarídeo xiloglucana	17
3.2.1 Aplicação biotecnológica	20
3.2.2 Extração e purificação	21
3.3 Caracterização de polissacarídeos	22
3.3.1 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier	23
3.3.2 Difração de raios X	23
3.3.3 Reologia	24
3.3.4 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa	26
3.3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)	27
3.4 Membranas polissacarídicas	28
3.5 Lectinas	30
3.5.1 Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	32
3.6 Processo de cicatrização	33
3.6.1 Fase inflamatória	35
3.6.2 Fase proliferativa	37
3.6.3 Remodelamento	38
3.7 Avaliação do processo cicatricial	38
3.7.1 Avaliação clínica	39
3.7.2 Avaliação morfométrica	40
3.7.3 Avaliação histológica	40
3.8 Proteômica	41
4. Referências Bibliográficas	44
CAPÍTULO 1 Extração e caracterização físico-química da xiloglucana extraída de sementes de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>	60
CAPÍTULO 2 Preparação e caracterização de membrana bioativa de xiloglucana com concanavalina A incorporada	92
CAPÍTULO 3 Aplicação <i>in vivo</i> de membrana bioativa de xiloglucana com concanavalina A incorporada como curativo tópico	112

1. Introdução

Os polissacarídeos são polímeros difundidos na natureza e especialmente disponíveis a partir de plantas e microrganismos, representando uma fonte inesgotável de biopolímeros geralmente não tóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis (MKEDDER et al., 2013). Devido a facilidade de se obter polissacarídeos a partir de fontes naturais, estes se tornam mais baratos do que os polímeros sintéticos (COVIELLO et al., 2007). Membranas de polissacarídeos têm sido amplamente utilizadas no campo alimentício (CERQUEIRA et al., 2012) e farmacêutico como curativo tópico (MONTEIRO et al., 2007).

Xiloglucanas são heteropolissacarídeos normalmente encontrados nas paredes celulares primárias de plantas e nas sementes, com funções estruturais e de armazenamento, respectivamente. Apresentam em sua estrutura química uma cadeia central de (1→4)- β -D-glicose, ligada por pontes de hidrogênio na posição O-6 por ramos α -D-xilose e parcialmente ligada em O-2 por unidades de β -D-galactose (HAYASHI, 1989; BUCKERIDGE et al., 2010).

Hymenaea courbaril var. *courbaril*, uma árvore brasileira pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpiniaceae, popularmente conhecido por Jatobá, apresenta distribuição ampla, desde o sul do México até o Centro-Oeste do Brasil, ocorrendo também na Floresta Amazônica, no Cerrado e na Caatinga, no Nordeste Brasileiro (LEE; LANGENHEIM 1975; QUEIROZ, 2009).

As lectinas são glicoproteínas que possuem a capacidade de se ligar especificamente aos monômeros de carboidratos presentes em um biopolímero. Uma das lectinas mais habitualmente utilizada para o reconhecimento de carboidratos é a concanavalina A (ConA), esta possui a capacidade de se ligar a resíduos de D-glucose e D-manose nos terminais não redutores de polissacarídeos e glicoproteínas (ABHYANKAR et al., 2011). A lectina Concanavalina A (ConA) apresenta efeitos imunomoduladores em diversos estudos e tem sido utilizada como um agente mitogênico (MELO et al., 2011).

A cicatrização de feridas é um evento fisiológico cada vez mais elucidado e diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de otimizar o processo cicatricial. Apesar de existir grande número de produtos disponíveis para o tratamento de feridas, ainda se buscam substâncias tópicas com este propósito, tanto pela necessidade de ampliação do arsenal terapêutico quanto pela existência de controvérsias sobre o tratamento de feridas, pesquisas relatam a escassez de informações acerca dos efeitos adversos provocados por alguns componentes dos produtos comumente utilizados (FERREIRA et al., 2003; MARTINS et al., 2005).

Medicamentos para os mais diversos fins continuam sendo desenvolvidos, em sua grande maioria, de produtos naturais (SEGUNDO et al., 2007). Para aperfeiçoar a cicatrização de lesões

podem ser utilizados biomateriais, que consistem de materiais interativos capazes de estabelecer afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa pelo organismo (RATNER; BRYANT, 2004). Dentre os biomateriais destacam-se os polissacarídeos, os quais estimulam o sistema imune *in vitro* e *in vivo* e tendem a contribuir favoravelmente no processo cicatricial (KWEON et al., 2003; SENEL; McCLURE, 2004).

No presente trabalho, a xiloglucana contida nas sementes de *H.courbaril* foi extraída, o seu rendimento de extração foi determinado e as suas propriedades reológicas foram avaliadas. Foram produzidas e caracterizadas membranas deste polissacarídeo contendo a lectina concanavalina A (ConA) incorporada e o efeito no tratamento tópico utilizando as membranas frente a lesões cutâneas experimentais em camundongos foi avaliado.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo a extração e caracterização da xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*, preparação e caracterização das membranas deste polissacarídeo contendo concanavalina A incorporada e, avaliação do efeito destas membranas no tratamento tópico de lesões cutâneas experimentais em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Extração da xiloglucana proveniente das sementes de *Hymenaea courbaril*.
- Caracterização da xiloglucana por Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier, Difração de Raios X, Composição de Monossacarídeo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa - GCMS e ressonância magnética nuclear – RMN.
- Preparação das membranas de xiloglucana com e sem ConA incorporada.
- Caracterização das membranas quanto a cor e opacidade, as propriedades mecânica, a espessura, ao transporte de oxigênio e permeabilidade ao vapor de água.
- Avaliação do efeito cicatrizante após tratamento das lesões cutâneas experimentais utilizando as membranas bioativas e respectivos controles.
- Análise da evolução do processo de cicatrização durante 14 dias do ponto de vista clínico, microbiológico, histopatológico e proteômico.

3. Revisão de Literatura

3.1 *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*

Fabaceae Lindl. (ou Leguminosae Juss.) compreende 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS et al., 2005). Caesalpinioideae é composta de quatro tribos, com Detarieae s.l. Polhill (POLHILL; RAVEN 1981) abrangendo 82 gêneros, quase a metade do total reconhecido para a subfamília, da qual apenas 20% ocorrem nos Neotrópicos (LEWIS et al., 2005).

Detarieae s.l. inclui atualmente duas subtribos, Detariinae (DC.) Meisn. e Amherstiinae (FOUGÈRE-DANEZAN et al., 2010; LEWIS et al., 2005), com um total de 90 gêneros, dos quais 58% ocorrem no continente africano, 20% nos Neotrópicos, e 12% na Ásia Tropical (LEE; LANGENHEIM, 1975). Detariinae divide-se em cinco grupos informais, com o “grupo Hymenaea” incluindo os gêneros *Guibourtia* Bennett, *Hymenaea* L. e *Peltogyne* Vogel, caracterizados principalmente pelas folhas bifolioladas de folíolos fortemente assimétricos (FOUGÈRE-DANEZAN et al., 2010).

Para *Hymenaea*, são reconhecidas atualmente duas seções e 12 espécies, 11 distribuídas do México à América do Sul e uma na costa leste da África. Atualmente, são aceitos 16 táxons infraespecíficos (LIMA; PINTO, 2013), tendo todos estes a hierarquia varietal. No Brasil, ocorrem 12 espécies de *Hymenaea* com todas as variedades para elas reconhecidas, totalizando 23 táxons (LEE; LANGENHEIM, 1975; LEWIS et al., 2005). A maioria dos táxons neotropicais tem como nomes populares mais comuns “algarrobo”, “guapinol”, “jatobá”, “jutaí” e “locust”.

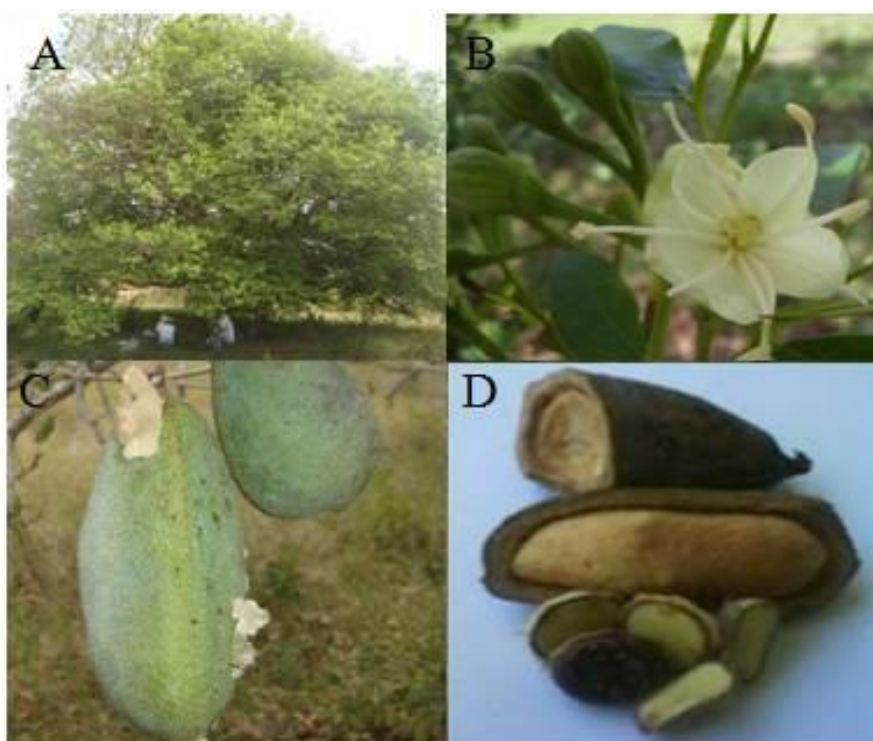
A resina é usada na manufatura de incenso, cola, verniz, goma-laca e remédios caseiros (LEWIS et al., 2005). A madeira pode ser usada na fabricação de mobília, instrumentos musicais, barcos, madeira comprimida, marcenaria e tornearia em geral. Ainda, algumas espécies são cultivadas como ornamentais (LEWIS et al., 2005). As espécies deste gênero são também importantes na recuperação de áreas degradadas, especialmente *H. courbaril*, por ser pouco exigente em relação à fertilidade e à umidade do solo, tem sido utilizada na composição de reflorestamentos heterogêneos e na arborização de parques e grandes jardins (CARVALHO FILHO et al., 2003).

Segundo Ducke (1935), a espécie *Hymenaea courbaril* ocorre no Brasil em raças geográficas distintas mas ligadas por formas intermediárias, agregando atualmente um total de seis táxons infraespecíficos: *H. courbaril* L. var. *courbaril*, *H. courbaril* var. *altissima* (Ducke) Lee & Lang., *H. courbaril* var. *longifolia* (Benth.) Lee & Andrade-Lima, *H. courbaril* var.

stilbocarpa (Hayne) Lee & Lang., *H. courbaril* var. *subsessilis* Ducke e *H. courbaril* var. *villosa* Lee & Andrade-Lima. A espécie *H. courbaril* apresenta a maior área de ocorrência registrada para o gênero, principalmente *H. courbaril* var. *courbaril* e *H. courbaril* var. *stilbocarpa*.

Hymenaea courbaril var. *courbaril* (figura 1) é, dentre todos os táxons de *Hymenaea*, o que apresenta a distribuição mais ampla, desde o sul do México até o Centro-Oeste do Brasil, coincidindo com quase toda a área de ocorrência do gênero reconhecida para o Novo Mundo (LANGENHEIM et al., 1982), ocorrendo principalmente na Floresta Amazônica e também no Cerrado (LEE; LANGENHEIM, 1975). Queiroz (2009) cita a ocorrência desta variedade também na Caatinga, no Nordeste do Brasil. O tamanho dos indivíduos varia em conformidade com a ampla diversidade de ambientes colonizados, desde 10 a 20 m de altura em áreas mais abertas e secas, até mais de 40 m em florestas pluviais (LEWINSOHN, 1980). Porém, Lee e Langenheim (1975) enfatizam que esta variedade é mais frequente em ecossistemas mais secos tanto ao norte quanto ao sul da Bacia Amazônica.

Figura 1 – Árvore (A), Flores (B) e Fruto com sementes de *H. courbaril* var. *courbaril* (C e D)



FONTE: Arruda I.R.S (2013)

As sementes de *Hymenaea courbaril* var *courbaril*, são importantes fonte do carboidrato de reserva como a xiloglucana e cada árvore produz, em média, 10 kg de sementes por ano e é encontrada em território brasileiro (BUSATO et al., 2001).

3.2 Polissacarídeo xiloglucana

Nas últimas décadas, numerosas pesquisas com plantas medicinais usadas como “remédio”, pela população, têm sido desenvolvidas no Brasil. Na medicina popular, estas espécies são fontes de biopolímeros que desempenham diversas funções em processos metabólicos, sendo que sua importância e atividade dependem da estrutura e do grupo funcional que está ligado ao biopolímero (LEHNINGER, 2006).

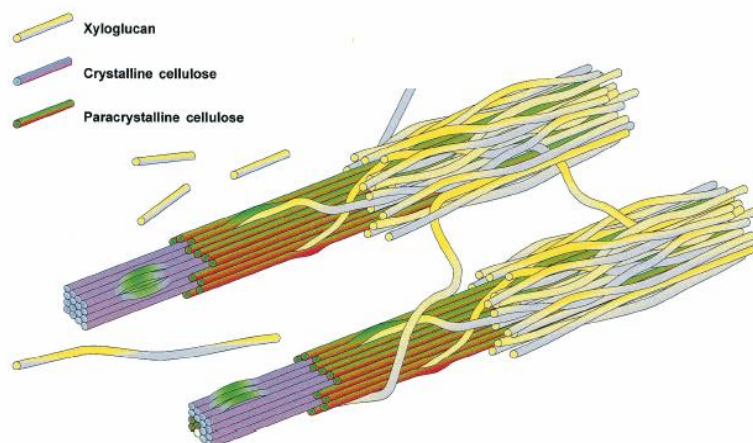
Os polissacarídeos são bem distribuídos na natureza e disponíveis a partir de plantas e microrganismos. Estes são uma fonte inesgotável de biopolímeros geralmente não tóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis, sendo também os principais constituintes químicos das plantas, isto porque, formam a parede celular que é o suporte estrutural das células vegetais (MKEDDER et al., 2013).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando polissacarídeos diferentes, como as xiloglucanas e a celulose (Figura 2). Quando ocorre uma variação da pressão osmótica na célula vegetal, a xiloglucana atribui propriedades mecânicas a parede celular das plantas, permitindo a expansão e a não rotura da célula (BUCKERIDGE et al., 2010).

A xiloglucana é uma das principais hemiceluloses presentes em paredes celulares das sementes de dicotiledôneas, também podendo ser acumulada como polissacarídeo de reserva nas sementes de algumas Caesalpinoideae. Este, como muitos outros polissacarídeos, é potencialmente importante para aplicações na indústria alimentar e médica (LUBAMBO et al., 2011).

Os polissacarídeos de sementes são exemplos de classes de compostos naturais que têm contribuído na classificação da família Caesalpinoideae, especial ênfase tem sido dada as xiloglucanas (ROSÁRIO et al., 2008; KAI; PETKOWICZ, 2010; FREITAS et al., 2011).

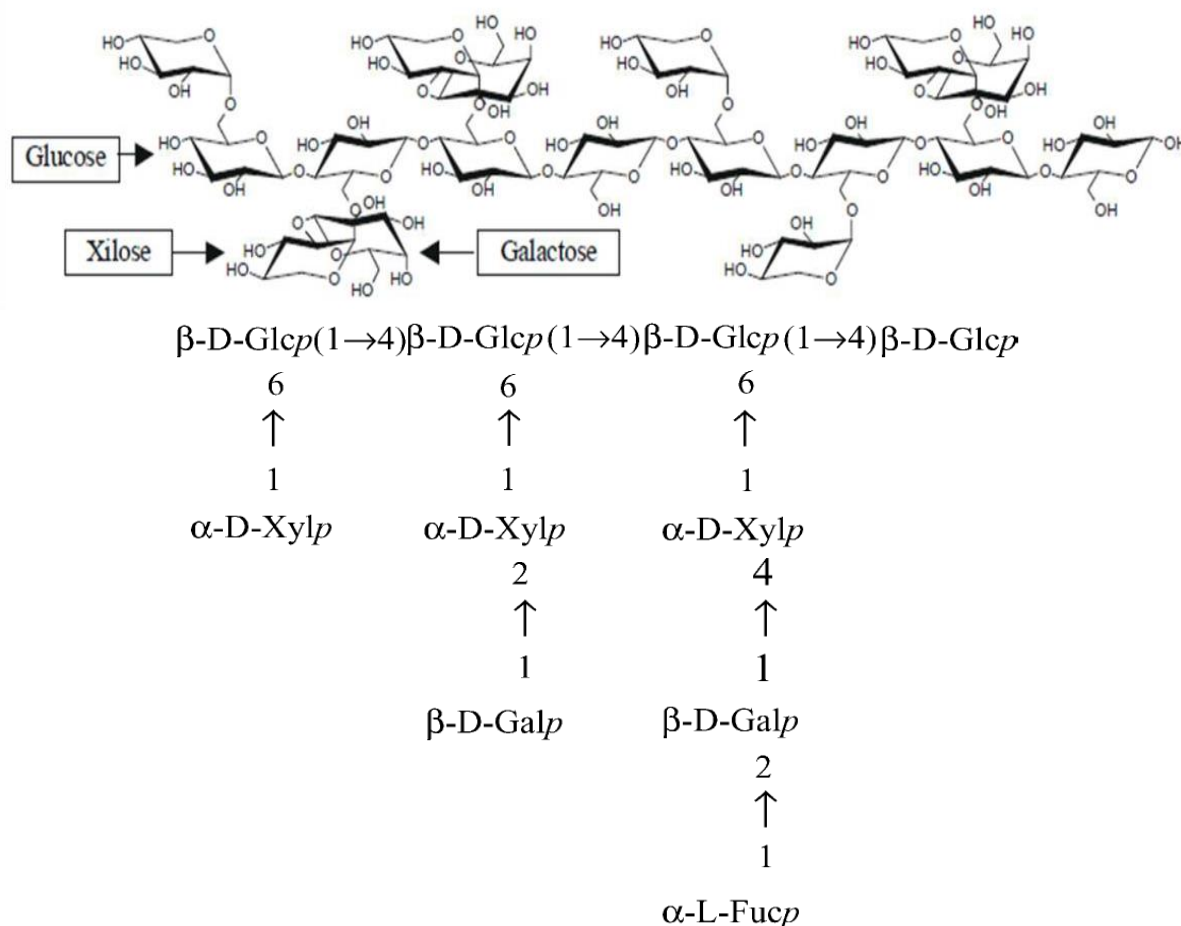
Figura 2 – O polissacarídeo xiloglucano na estrutura da parede celular vegetal



FONTE: Adaptado de Zykwinska et al. (2008).

Estruturalmente as xiloglucanas são compostas de uma cadeia principal de glucose unida por ligações β -(1,4), onde ocorrem ramificações regulares com xilose ligada em α -(1,6) (Figura 3). Algumas destas xiloses ainda podem apresentar ramificações por galactose ligadas em α -(1,2). Em parede celular primária, mas não em parede celular de reserva, as ramificações por galactose ainda podem ser ramificadas por fucose ligada em α -(1,2) (HAYASHI, 1989; JÓ et al., 2010).

Figura 3 – Segmento representativo de uma cadeia de xiloglucana de origem vegetal



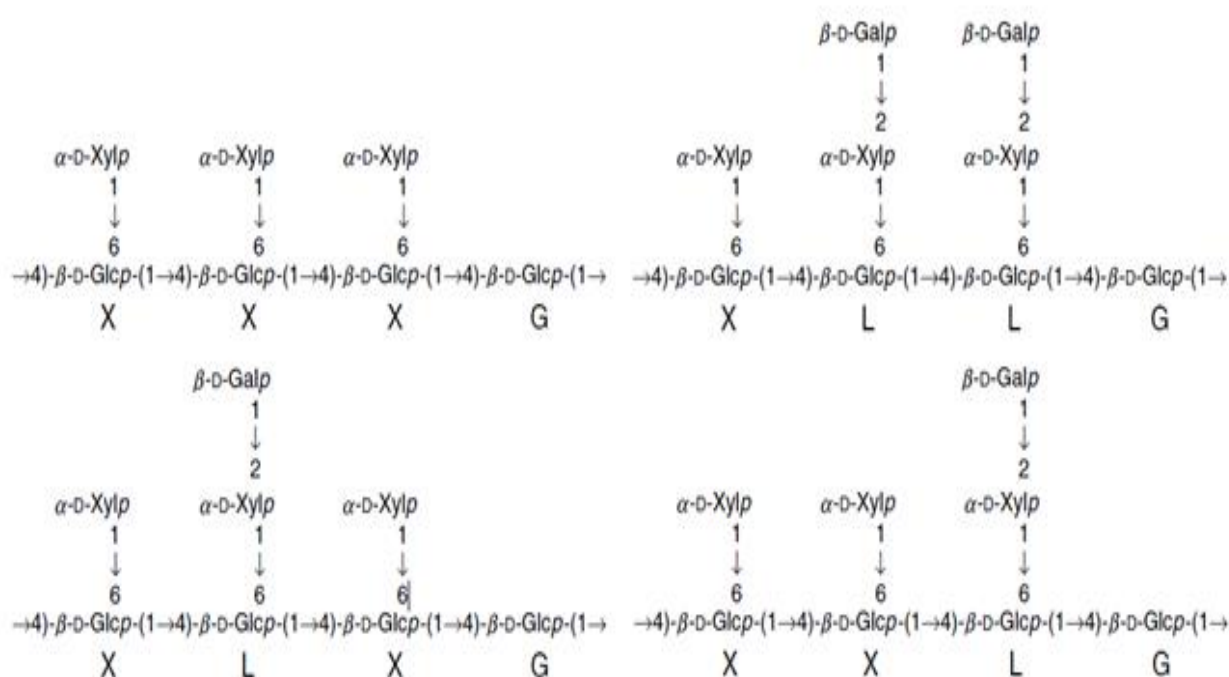
FONTE: Modificado de Busato et al. (2005). Representação da estrutura molecular da xiloglucana de reserva contendo cadeia principal de glucose unida por ligações β -(1,4) e ramificações regulares com xilose ligada α -(1,6). Algumas destas xiloses podem apresentar ramificações com galactose ligadas em α -(1,2).

Os padrões de ramificação das xiloglucanas dependem das espécies da planta, esta variação da estrutura está diretamente ligada à funcionalidade e as propriedades físico-químicas do polissacarídeo. A solubilidade das soluções aquosas de xiloglucanas esta intimamente relacionada à quantidade dos resíduos de galactose, onde a remoção por β - galactosidases de parte destes (até 44%) pode levar a formação de gel por este polissacarídeo modificado (COVIELLO et al., 2007). Outro exemplo, é o caso da xiloglucana extraída a partir da semente de *Tamarindus* (JÓ et al., 2010; BERGSTROM et al., 2012) onde a galactose foi substituída pela xilose modificando o grau de associação entre suas moléculas, aumentando a solubilidade em água desta xiloglucana. De modo

que o efeito da razão de substituição de galactose e a composição das unidades influenciam as propriedades das soluções aquosas de xiloglucana (BUSATO et al., 2009).

Xiloglucanas de diferentes fontes, por exemplo, *Tamarindus*, *Hymenaea*, *Detarium*, ou *Azelia africana* mantiveram o padrão de substituição de xilose e galactose de forma não aleatória, onde apenas alguns padrões foram encontrados entre elas (WANG et al., 1997; REN et al., 2005; LUCYSZYN et al., 2009; JÓ et al., 2010) os padrões consistem em unidades com diferentes proporções de monossacarídeos, como XXXG, XLXG, XXLG, XLLG (onde X é um resíduo de glicose ligado a xilose, G é um resíduo de glicose não ligado, e L é um resíduo de glicose-ligado a xilose ligada a galactose) como mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química das unidades de ramificação da xiloglucana.



FONTE: Nishinari, et al. (2007). Onde, X: resíduo Glc-Xil, L: resíduo de Glc-Xil-Gal e G: resíduo Glc não ligado.

No Brasil, as xiloglucanas vêm sendo estudadas desde 1993, quando Lima et al. (1993) a isolaram a partir das sementes de *Hymenaea courbaril*, conhecido popularmente como jatobá. Posteriormente, Lima et al. (1995) isolaram e estudaram alguns polissacarídeos obtidos através de hidrólise enzimática, comprovando que a composição dos polissacarídeos presentes nas sementes de *Hymenaea courbaril* eram similar aqueles encontrados nas sementes de *Tamarindus indica*.

3.2.1 Aplicação biotecnológica

Polissacarídeos de varias fontes (fungos, musgos, plantas superiores) possuem uma ampla gama de aplicações, especialmente, nas áreas alimentícias, biomédicas, farmacêuticas e cosméticas. Na área biológica, eles são aplicados em engenharia de tecidos, como matriz para imobilização de moléculas e construção de biossensores, assim como veículo de liberação de fármacos (CUNHA et al., 2009).

A principal xiloglucana utilizada comercialmente em indústrias de alimentos e médicas é a extraída das sementes de *Tamarindus indica*, Kochumalayil et al. (2013) com interesse em polissacarídeos para aplicação em embalagens, modificaram a xiloglucana adquirida da empresa (Innovassynth tecnologias Ltd., Índia) e obtiveram um novo polímero com desempenho superior aos polímeros atuais à base de petróleo em uso na indústria. Jó et al. (2010) visando uma aplicação para transporte de drogas, avaliaram a capacidade da formação de nano-agregados com uma xiloglucana obtida pela empresa (Balasanka Mills Co., Índia) e encapsularam a camptotecina (um fármaco anti-cancêr) com eficiência de 42% de encapsulação.

Estudos demonstram que as propriedades biológicas de polissacarídeos são dependentes de uma variedade de parâmetros estruturais, como composição monossacarídica, tipo e configuração da ligação glicosídica, tamanho dos pontos de ramificação, peso molecular e a presença de substituição por grupos polares e apolares (NISHINARI et al., 2007).

As xiloglucanas também existem como um polissacarídeo de armazenamento em algumas sementes de árvores como; *Tamarindus*, *Impatiens*, *Annona*, *Tropaeolum*, *Hymenaea*, e *Detarium* (NISHINARI et al., 2007). E podem ser extraídas a partir de sementes de diferentes espécies, tais como *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Tamarindus indica* e as suas estruturas químicas variam de acordo com a origem (ROSÁRIO et al., 2011).

Xiloglucana extraída das sementes de plantas entre elas a *Hymenaea courbaril* var. *courbaril*, conhecida popularmente por jatobá (BUCKERIDGE et al., 1997), apresenta capacidade de formar matrizes para a imobilização de moléculas bioativas (LUCYSZYN et al., 2011). E suas sementes constituem um número de 2 a 8 por fruto, possuindo cor vinho, forma oval, e apresentando, em média, 2 cm de comprimento (SOUZA; LIMA, 1997).

Rosário et al. (2008) extraíram xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM), e utilizaram para avaliar a produção de óxido nítrico e oxigênio no recrutamento de macrófagos em peritônio de ratos, onde todas as xiloglucanas promoveram um aumento no número de macrófagos peritoneais de forma dependente da dose, característico de polissacarídeos com atividade imunomoduladora.

O polissacarídeo xiloglucana dependendo da sua origem apresenta aplicações diversas

algumas das quais estão listadas na tabela 1.

Tabela 1: Origem e aplicações de xiloglucana extraído de diversas fontes.

Origem	Aplicação	Referência
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Elaboração de geleias ricas em fibra alimentares e livres de açúcares	SILVA et al., 2001
<i>Hymenaea courbaril</i>	Fimes	FURTADO et al., 2012
<i>Tamarindus indica</i>	Produção de nano-agregados para transporte de drogas	JÓ et al., 2010
<i>Hymenaea courbaril</i>	Imunomoduladores	ROSÁRIO et al., 2008
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Imunomoduladores	ROSÁRIO et al., 2008; CUNHA et al., 2009
<i>Mucuna sloanei</i>	Imunomoduladores	ROSÁRIO et al., 2008; CUNHA et al., 2009

Além de apresentar inúmeras funções biológicas, muitos polissacarídeos derivados de plantas são relativamente não tóxicos e não causam significantes efeitos colaterais que são uns dos maiores problemas associados com polissacarídeos isolados de bactérias e compostos sintéticos. Desse modo, polissacarídeos extraídos de plantas são candidatos ideais com potencial terapêutico e fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos de valor medicinal (CUNHA et al., 2009, FURTADO et al., 2012).

O Brasil apresenta fontes de espécies diversificadas para a extração de xiloglucanas a partir de sementes que poderiam suprir a demanda de importação deste polissacarídeo, além de incluir a melhoria do valor agregado pela utilização de sementes sem capacidade germinativa (BUSATO et al., 2001).

3.2.2 Extração e purificação

A extração de polissacarídeos seguida da purificação ou fracionamento, que minimiza a contaminação dos mesmos por outros materiais tais como proteínas e monossacarídeos, constitui uma etapa muito importante, determinando a viabilidade ou não deste processo. Metodologias distintas têm sido propostas para extração de xiloglucanas de sementes, principalmente no que se refere ao solvente utilizado e ao tempo, à temperatura e o processo de inativação enzimática aplicado (FREITAS et al., 2005; ROSÁRIO et al., 2008; LUCYSZYN et al., 2009).

Estudos envolvendo extração de polissacarídeos de sementes incluem, além do cálculo dos rendimentos da extração, a caracterização de suas propriedades físico-químicas. Estes podem ser obtidos mediante extração aquosa após o endosperma ser separado do embrião. Esse processo pode ser realizado pela fervura das sementes em água ou álcool até que a separação manual dos componentes da semente seja possível (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA, 2000). A maioria dos métodos de extração de xiloglucanas de sementes descritos na literatura é composta por duas etapas básicas, onde as sementes moídas passam por extração aquosa seguida de purificação pela precipitação alcoólica. Resumidamente, um extrato bruto é obtido com as semente descascadas (após fervura para inativação enzimática) e trituradas em água a uma faixa de temperatura que pode variar entre 20 e 80°C e, em seguida, é precipitado com álcool numa proporção de água:álcool que pode variar entre 1:1 e 1:3. Não foram relatados efeitos da temperatura e do álcool sobre a estrutura das xiloglucanas (BUSATO et al., 2009; KAI; PETKOWICZ, 2010; FREITAS et al., 2011).

No entanto, Lucyszyn et al. (2009) observaram que, para a extração utilizando NaCl no lugar da água permitiu um aumento da solubilização das proteínas livres contaminantes (efeito *salting in*) e, em seguida, a centrifugação removeu a maior parte da contaminação proteica do extrato bruto, contribuindo com a purificação com rendimento em massa de xiloglucana de 38%. Freitas et al. (2005) e Busato et al. (2009) desenvolveram metodologias para a extração de xiloglucana de sementes de *H. coubaril* semelhante as descritas na literatura porém adicionaram etapas de lavagens após a precipitação alcoólica, afim de aumentar o grau de pureza do polissacarídeo, onde o precipitado foi lavado com etanol 100% e acetona PA, permitindo a remoção da contaminação por monossacarídeos e proteínas, com rendimentos em massa de xiloglucana de 15,5% e 16,8%, respectivamente. Levando em conta o rendimento e pureza da xiloglucana, bem como o custo e a simplicidade do procedimento, o método descrito por Lucyszyn et al. (2009) pareceu ser o mais vantajoso para a aplicação proposta.

3.3 Caracterização de polissacarídeos

Os parâmetros mais importantes que são utilizados na definição da natureza de um polissacarídeo são: razão dos monossacarídeos, peso molecular médio, estrutura fina e viscosidade intrínseca (CERQUEIRA et al., 2011). O teor de monossacarídeos e sua razão geralmente são determinados por cromatografia gasosa ou por cromatografia de troca iônica de alta pressão, após hidrólise ácida total ou parcial do polissacarídeo. O peso molecular pode ser determinado por cromatografia de exclusão molecular por tamanho. A distribuição e os tipos de ligação dos

monossacarídeos ao longo da cadeia de principal do polissacarídeo pode ser caracterizada por espectroscopia RMN ^{13}C ou por métodos enzimáticos capazes de degradar as regiões não substituídas do polissacarídeo (DAKIA et al, 2008; CERQUEIRA et al., 2009; CUNHA et al, 2009; VENDRUSCOLO et al., 2009). A viscosidade intrínseca, por sua vez, pode ser determinada usando um viscosímetro capilar, aplicando as equações de Huggins e Kramer (SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005; CERQUEIRA et al., 2009).

3.3.1 Espectroscopia de infravermelho transformada de fourier

Uma das técnicas mais úteis para a identificação de estruturas polissacarídicas é a espectroscopia de infravermelho, que se baseia na análise de picos de absorção de determinados comprimentos de onda, expressos em cm^{-1} (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011). Apresenta duas vantagens principais: requer pequenas quantidades de amostra (miligramas) e é um método não-agressivo com exatidão confiável (PEREIRA et al., 2003), no entanto, a técnica convencional necessita de procedimentos técnicos laboriosos para obter espectros com uma boa relação sinal/ruído (CHOPIN; WHALEN, 1993). Esta limitação foi superada com o desenvolvimento de técnicas de infravermelho interferométricas, associadas ao algoritmo transformado de Fourier, dando origem à espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (PEREIRA et al., 2009).

Para a análise estrutural de polissacarídeos (MATHLOUTHI; KOENIG, 1987), cinco regiões podem ser distinguidas no espectro normal (entre 4000 e 650cm^{-1}): (1) Região de estiramentos OH e CH, entre 3600 e 2800cm^{-1} ; (2) Região de simetria local, entre 1500 e 1200cm^{-1} ; (3) Região de estiramentos CO, entre 1200 e 950cm^{-1} ; (4) Impressão digital ou região anomérica, entre 950 e 700cm^{-1} e (5) Região esquelética, abaixo de 700cm^{-1} . Assim, informações sobre composição e estrutura podem ser obtidas a partir do FTIR, para caracterização de polissacarídeos. As bandas de absorção da espectroscopia de infravermelho a aproximadamente 3420, 2900, 1600, 1300 e 940cm^{-1} são utilizadas para obter informações sobre a estrutura de polissacarídeos do tipo xiloglucana (PETIBOIS et al., 1999; SUN et al., 2005; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011; GU; CATCHMARK, 2012; KAUR, 2012; RUIZ et al., 2013)

3.3.2 Difração de raios X

A técnica de difração de raios-X (DRX) é um método preciso e eficiente, largamente empregado em pesquisa científica e tecnológica, particularmente, para ensaios não-destrutivos em aplicações industriais. Na atualidade, é a única técnica para a caracterização microestrutural precisa

de estruturas cristalinas e amorfas, mesmo para o caso de estruturas complexas, como é o caso de proteínas e vírus, e vem sendo aplicada em diferentes áreas, tais como, na visualização direta de imperfeições de planos atômicos, na quantificação em tempo real da dinâmica de fenômenos de transformações de fases, crescimento de cristais, geração de defeitos, processos e mecanismos de precipitação e difusão, entre outros. O princípio do método baseia-se no espalhamento elástico dos raios X ao atingirem um material, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo, o que quer dizer que após a colisão com o elétron, o fóton de raios X muda sua trajetória mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arranjados de maneira simétrica, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas a do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que os efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos (KAHN, 2012).

A medida da direção de espalhamento dos feixes difratados permite a determinação de propriedades fundamentais de materiais no estado cristalino, bem como das propriedades da unidade celular do cristal e sua simetria (CULLITY, 1978).

Atualmente, a principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de estruturas cristalinas poliméricas, a exemplo dos polissacarídeos, capazes de interagir naturalmente com a água e induzir transições estruturais, relacionadas a transições amorfo-cristalinas (MARTINS et al., 2012). O índice de cristalinidade do polissacarídeo, por sua vez, é medido como a porcentagem de cristalinidade do polímero e está relacionado ao alinhamento das moléculas na sua estrutura (MUDGIL et al., 2012).

3.3.3 Reologia

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões (BARNES et al., 1989). Dentro deste contexto, os materiais podem ser definidos como sólidos ou líquidos. Schramm (2006) define como sólidos ideais aqueles que se deformam elasticamente, ou seja, a energia necessária para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida. Conforme o mesmo autor, fluidos ideais são aqueles que se deformam irreversivelmente, pois fluem sob ação de uma tensão. A energia requerida neste processo é dissipada em forma de calor e não é recuperada quando a tensão é retirada.

O tipo mais comum de deformação dos fluidos é por cisalhamento simples, que gera um escoamento caracterizado pelo movimento relativo das moléculas do fluido devido à ação de uma força externa. Uma das principais propriedades medidas na deformação de fluidos é a viscosidade,

que assim como o módulo elástico (para sólidos) é um fator determinante para o uso e aplicações dos materiais fluidos. Além de ser uma medida direta da qualidade do fluido em serviço, a viscosidade pode fornecer importantes informações sobre variações estruturais que ocorrem durante a aplicação de uma deformação ou tensão. A viscosidade, portanto, pode ser definida como a resistência ao movimento do fluir de um material (BARRA, 2012).

Nesse contexto, a discussão dos conceitos de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento torna-se importante para o entendimento dos conceitos físico e matemático da viscosidade. A tensão de cisalhamento é caracterizada como a força aplicada por unidade de área cisalhante, necessária para manter o escoamento do fluido, enquanto a taxa de cisalhamento está relacionada ao deslocamento relativo das moléculas do fluido. A teoria de Newton para a viscosidade se restringe para um determinado número de fluidos, entretanto, existem materiais que, sob escoamento dirigido por cisalhamento, apresentam comportamento distinto do previsto por Newton. Em alguns fluidos, a viscosidade depende do cisalhamento aplicado ou do tempo de sua aplicação, ocasião em que deixa de ser uma propriedade constante para se tornar dependente das condições em que o fluido é deformado e quando, então, passa a ser denominada viscosidade aparente (BARRA, 2012).

Fluidos com comportamento não newtonianos podem ser classificados em pseudoplásticos, dilatantes e plásticos (SCHRAMM, 2006), isto é:

I- Fluidos pseudoplásticos: apresentam uma diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Isso ocorre porque, no repouso, as partículas e/ou as cadeias poliméricas que compõem o líquido encontram-se desorientadas, entrelaçadas ou enoveladas, mantendo uma ordem interna irregular que gera uma alta viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento, as partículas se orientam em direção ao fluxo e as moléculas poliméricas se desenovelam ou se desagregam e se alinham em direção ao fluxo, isso permite uma maior facilidade de escoamento, apresentando, assim, uma diminuição da viscosidade. Este tipo de comportamento é observado na maioria das soluções concentradas de polissacarídeos.

II- Fluidos dilatantes: apresentam comportamento inverso aos pseudoplásticos, ou seja, apresentam aumento de viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta.

III- Fluidos plásticos: necessitam a aplicação de uma tensão inicial mínima, que provoque uma ruptura na sua estrutura, para que o material comece a fluir e perder a viscosidade de maneira dependente da taxa de cisalhamento. O sistema apresenta ligações intermoleculares que formam uma rede e o caracterizam como sólido até que a força externa aplicada seja superior àquela que mantém esta rede, quando se observa um ponto de ruptura do gel.

Os fluidos não-newtonianos mencionados acima podem apresentar comportamento reológico dependente do tempo, sendo caracterizados como tixotrópicos ou reopéticos. Quando

aplica-se uma tensão aos fluidos tixotrópicos, ocorre um decréscimo na viscosidade aparente, que tende a retornar à condição inicial apenas após um tempo de repouso. Em contrapartida, os fluidos reopéticos apresentam um acréscimo na viscosidade aparente com o tempo de aplicação da tensão e a viscosidade inicial tende a ser recuperada apenas após o repouso (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade, enquanto que em líquidos a viscosidade é a propriedade mais importante (TONELI; MURR; PARK, 2005). Entre os dois comportamentos extremos existem os materiais que se comportam ora como líquidos ora como sólidos, dependendo da tensão, da frequência ou da temperatura a que são expostos. Estes materiais são denominados de viscoelásticos (BARNES et al., 1989).

Os experimentos reológicos dinâmicos se utilizam de tensões oscilatórias para analisar a viscosidade e a elasticidade das amostras, permitindo a avaliação do comportamento sólido ou líquido dos fluidos através dos valores de G' (módulo de armazenamento ou elástico) e G'' (módulo de perda ou viscoso). Ambos são expressos em Pascal (Pa) e compõem o módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total à deformação (NAÉ, 1993). A maioria dos polissacarídeos não podem ser considerados puramente elásticos ($G''=0$ e $G'=G^*$) ou puramente viscosos ($G'=0$ e $G''=G^*$), pois geralmente apresentam ambos os componentes G' e G'' (SCHRAMM, 2006).

Nesse contexto, é importante identificar a região de comportamento viscoelástico linear, isto é, as condições nas quais existe uma relação linear entre a deformação sofrida e a tensão imposta ao material. A região de viscoelasticidade linear é limitada para a faixa de amplitude para qual G^* é constante, garantindo que a amostra não seja deformada para o ponto em que a ligação interna temporária da molécula ou dos agregados seja destruída, e a maior parte da energia introduzida é irreversivelmente perdida como calor (FERRY, 1980).

A propriedade reológica envolve diferentes mecanismos de associação entre cadeias, as quais dependem das características individuais de cada polímero, sendo assim, géis e soluções de diferentes polímeros apresentarão formas e texturas diferentes, podendo ser aplicados em diferentes tipos de indústrias (TONELI; MURR; PARK, 2005; TOSIN, 2008). As soluções de xiloglucanas obtidas de sementes de *H. courbaril* geralmente exibem um comportamento não-newtoniano, em que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (BUSATO et al., 2009).

3.3.4 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

A técnica GC-MS revolucionou a análise dos compostos voláteis e permitiu obter

informação importante sobre misturas de compostos sintéticos ou naturais. Em termos instrumentais esta técnica consiste na junção de um cromatógrafo gasoso e de um espectrômetro de massa, em que este funciona como um sistema de detecção altamente específico e universal (JICKELLS; NEGRUSZ, 2008). Para determinação de compostos polares por GC-MS é necessário a utilização da etapa de derivatização, que permite a modificação da funcionalidade da molécula, aumenta a sua volatilidade, diminui a polaridade e melhora a sua estabilidade. A derivatização permite também a redução da adsorção do analito no GC, melhorando a resposta no seu detector e uma separação mais eficiente dos picos cromatográficos (WORDS, 1997).

No GC-MS a amostra é injetada no capilar do GC, os seus constituintes são separados na coluna e entram no espectrômetro de massa através da interface, estes são ionizados e fragmentados na fonte de ionização e posteriormente analisados e detectados. Os componentes do espectrômetro de massa têm de estar sob sistema de vácuo, permitindo a conversão da maior parte das moléculas em íons, com um tempo de retenção satisfatório para ser analisado (SKOOG et al., 2006).

A amostra é vaporizada e transportada para a fonte de ionização. Naturalmente, as amostras introduzidas no espectrômetro de massa são tipicamente neutras necessitando, portanto de serem ionizadas. A fonte de ionização mais comum em espectrometria de massa é por impacto eletrônico, ocorrendo um bombardeamento de elétrons na amostra com elevada energia. É gerado um feixe de elétrons num filamento aquecido, na fase gasosa de alta energia, onde elétrons térmicos são acelerados através de uma diferença de potencial incidente na amostra e são emitidos, produzindo íons positivos e negativos ou espécies neutras, por perda ou ganho de elétrons (JICKELLS; NEGRUSZ, 2008).

Os cátions são conduzidos para o analisador de massa por repulsão eletrostática. O analisador de massa tem a função de selecionar os íons de acordo com os seus valores massa/carga (m/z). Os analisadores mais comumente utilizados são o quadrupolo e o ion trap (armadilha de íons) (SKOOG et al., 2006; JICKELLS; NEGRUSZ, 2008).

A análise de dados é controlada por um computador, que segue as instruções pré-definidas do operador. O controle da função de varredura é de extrema importância visto que desta resulta os dados necessários para a caracterização dos produtos analíticos. O traçado cromatográfico é feito somente com base no sinal gerado por alguns íons de massas selecionadas por serem característicos de uma determinada amostra (SKOOG, HOLLER; NIEMAN, 2002).

3.3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Copolímeros são macromoléculas formadas a partir de dois ou mais monômeros de

estruturas químicas diferentes. As propriedades físicas dos novos produtos poliméricos obtidos são características importantes a serem analisadas, por exemplo, através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C e a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (RZAEV et al., 2001).

A espectroscopia de RMN permite o estudo do encadeamento dos monômeros, levando em consideração a configuração dos carbonos anoméricos na cadeia macromolecular, identificando e quantificando diferentes preparações e compostos. Nos dias de hoje, a espectroscopia de RMN surge como uma das mais importantes técnicas para análise estrutural de polissacarídeos permitindo uma caracterização estrutural direta, fornecendo informações sobre: quantidade relativa de seus componentes, composição monossacarídica, posição e tipo da ligação glicosídica (TOSIN, 2008).

Xiloglucanas possuem características estruturais peculiares que podem ser identificadas em espectros unidimensionais (1D e 2D) de próton (^1H) e carbono (^{13}C). A complexidade estrutural desses compostos proporciona sobreposição de sinais em espectros de uma dimensão (1D) por esse motivo são realizadas as técnicas de separação espectral que permitem isolar os carbonos quando seus sinais estão sobrepostos. No entanto para a realização e obtenção destes espectros 2D com alta qualidade é necessário a utilização de aparelhos mais modernos e por um período bem maior de tempo (BUSATO et al., 2001; LUCYSZYN et al., 2011; MAHAJAN et al., 2013). A utilização da técnica de espectroscopia de RMN uni e bidimensional é suficiente para caracterização estrutural completa dos polissacarídeos, bem como na determinação de possíveis contaminantes e ou artefatos provenientes do processo de extração laboratorial.

3.4 Membranas polissacarídicas

Membranas polissacarídicas podem ser produzidas pela técnica de “solvent casting”, também denominada de método de evaporação de solvente, este método é o processo mais utilizado para a produção de membranas polissacarídicas na literatura devido a sua simplicidade e baixo custo (TANG et al., 2010; SIEVENS-FIGUEROA et al., 2012). No método de evaporação de solvente os polissacarídeos são primeiramente solubilizados em um solvente adequado, e em seguida a solução é transferida ou espalhada em um molde, superfície não adesiva, para a secagem em uma estufa para que o solvente evapore, depois que todo o solvente foi evaporado, a membrana seca pode ser retirada do suporte (JONES; MEDLICOTT, 1995; MORALES; MCCONVILLE, 2011). Para uma maior uniformidade da matriz é recomendado a eliminação das bolhas de ar da solução que podem ser formadas durante a homogeneização dos materiais (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Outros métodos também são empregados para formação de membranas, o processo de

nebulização “spraying”, onde a membrana é formada por deposição de gotículas atomizadas, formando camadas homogêneas de membranas (KFURI, 2003). e o processo de extrusão a quente, onde os compostos são misturados e então submetidos à pressão e aquecimento, em seguida o material é forçado a passar por uma matriz onde será modelado (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Devido às condições de processo, esse método possui a desvantagem da degradação de componentes termosensíveis, por isso a produção por evaporação de solvente é a mais utilizada (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Um dos problemas encontrados no processo de evaporação do solvente é que quando sistemas heterogêneos são empregados, como, por exemplo, quando o fármaco ou o polissacarídeo não forem solúveis no solvente, ocorre segregação durante a secagem da membrana, resultando em membranas com duas ou mais camadas diferentes, inviabilizando futuras aplicações (KFURI, 2003).

A estrutura de membranas polissacarídicas é dependente do estágio no qual ocorre a separação de fases. Se a separação ocorrer precocemente, por exemplo, antes da formação do gel, então será obtido uma membrana com poros abertos em sua estrutura. De outra forma, se a separação ocorrer em um estágio posterior da formação da membrana, quando as moléculas do polissacarídeo já estiverem interagindo fortemente, após a formação do gel, então membranas contendo poros fechados em sua estrutura serão formados. E se nenhuma separação ocorrer, membranas com estrutura densa serão formadas de maneira similar as membranas preparadas com solventes ideais (JONES; MEDLICOTT, 1995).

Para a formação de membranas bioativas, a escolha do polissacarídeo é importante, onde deve ser levada em consideração sua afinidade com o composto ativo de interesse e as propriedades mecânicas das membranas, pois a membrana deve ser suficientemente resistente para ser manuseada e transportada sem ser danificada, além de manter o composto ativo estável até que ele seja liberado (DIXIT; PUTHLI, 2009; NAGAR; CHAUHAN; YASIR, 2011). Dentre os polímeros utilizados para produção de filmes pode-se destacar o uso da quitosana (BOURBON et al., 2011; ABRUZZO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2013), celulose (NISHIMURA et al., 2009), galactomanana (CERQUEIRA et al., 2010; VALENGA et al., 2012) e xiloglucana (FURTADO et al., 2012; AVACHAT et al., 2013).

As desvantagens das membranas contendo polissacarídeos de fontes naturais em relação aos de polímeros sintéticos, é que aqueles não apresentam boas características mecânicas, além de apresentarem uma maior sensibilidade à água, maiores valores de permeabilidade ao vapor de água (AUDIC; CHAUFER, 2005). Estudos envolvendo a otimização das características mecânicas e físico-químicas de membranas polissacarídicas pela adição de diferentes plastificantes foram realizados e sugerem que a adição dessas substâncias pode amenizar consideravelmente tais

desvantagens (AUDIC; CHAUFER, 2005; VANIN et al., 2005; GODBILLOT et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2012). Os plastificantes são utilizados na produção de membranas com a função de melhorar a flexibilidade e manuseabilidade, e para a escolha do plastificante deve-se levar em consideração a afinidade com polissacarídeo e com o componente ativo a ela adicionado, de forma que o plastificante não cristalize na membrana após a secagem (DIXIT; PUTHLI, 2009; CERQUEIRA et al., 2012). A adição de um agente plastificante é necessária para superar a fragilidade das membranas polissacarídicas, que ficam quebradiças devido às extensivas forças intermoleculares. Os plastificantes reduzem essas forças, suavizam a rigidez da estrutura da membrana e aumentam a mobilidade entre as cadeias biopoliméricas, melhorando as propriedades mecânicas do filme (DIXIT; PUTHLI, 2009).

A xiloglucana, um polissacarídeo extraído de sementes de *H. courbaril*, vem sendo extensivamente investigada como possível uso para formação de membranas (KAI; PETKOWICZ, 2010; ROSÁRIO et al., 2008). Uma infinidade de compostos ativos pode ser adicionada a membranas bioativas, estes compostos irão garantir a funcionalidade das membranas polissacarídicas. Devido a esta característica, este trabalho preparou membranas de xiloglucana com ConA incorporada para aplicação em curativos tópicos.

3.5 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica capazes de interagir especificamente com carboidratos, aglutinar células animais e/ou vegetais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolípídeos (CAVADA et al., 2001).

Esta definição implica que diferentes glicoconjugados, idênticos ou estruturalmente similares, podem agir como receptores para a mesma lectina e que a presença de no mínimo um domínio não catalítico, o qual se liga reversivelmente a um carboidrato específico, é o único pré-requisito para uma proteína ser considerada uma lectina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Os sítios de ligação a carboidratos, presentes na molécula de lectina interagem como carboidrato específico através do mecanismo do tipo chave-fechadura, envolvendo pontes de hidrogênio, ligação metálica, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (KENNEDY et al., 1995).

A especificidade das lectinas é determinada pela conformação exata dos sítios de ligação e da natureza dos resíduos de aminoácidos para os quais o carboidrato é ligado. Dessa forma, pequenas alterações na estrutura dos sítios de ligação, como por exemplo, a substituição de apenas um ou dois resíduos de aminoácidos, podem resultar em alterações significativas na especificidade da lectina sem, no entanto, afetar sua estrutura tridimensional (SHARON; LIS, 1995).

As lectinas apresentam uma distribuição ubíqua na natureza, sendo encontradas tanto em organismos procariotos como em eucariotos (WANG; NG, 2003). A maioria das lectinas conhecidas foram isoladas de sementes, folhas, cascas, frutos, raízes, bulbos e tubérculos (RUDIGER et al., 2000). Sendo essas proteínas extraídas principalmente de sementes de leguminosas (SHARON; LIS, 1995). Entre as lectinas de plantas mais estudadas e caracterizadas estão incluídos: *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Phosphocarpus tetragonolobus* (WBL), *Triticum vulgare* (WGA) e *Lycopersicon esculentum* (lectina do tomate) (KOMPELLA; LEE, 2001).

A ampla ocorrência das lectinas vegetais e, a variedade de especificidade por carboidratos, despertou o interesse para investigações das funções destas proteínas que resultou nas seguintes atividades (SHARON; LIS, 2004): renovação de glicoproteínas do soro e defesa contra patógenos (CHANG; ZHU, 2002); proteínas de estocagem e adsorção viral e resposta imunológica (CHEN et al., 2005); transporte de carboidratos (KAMIYA et al., 2005); mediação da interação célula-célula e patógeno-hospedeiro (SAOUROS et al., 2005). Porém uma das grandes importâncias fisiológicas da lectinas está associada a sua utilização como reagentes policlonais para investigar as bases moleculares no controle da ativação e proliferação de linfócitos; para identificar e fracionar células do sistema imune e como drogas (SINGH et al., 2005).

Lectinas vegetais vêm recebendo atenção particular devido a sua potencial aplicação em análises laboratoriais, já que possuem especificidade por carboidratos diferentes, sendo rapidamente imobilizadas em suportes inertes (BASZKLIN et al., 2000). As matrizes comerciais de afinidade contendo lectinas são amplamente utilizadas na purificação de glicoproteínas de membrana ou glicolípídeos e em estudos de caracterização de enzimas e receptores (LIMA et al., 1997).

Em algumas sementes de leguminosas, a localização das lectinas está bem caracterizada. A maioria dos estudos indica que as lectinas estão localizadas no parênquima celular, em vacúolos especializados denominados corpos proteicos (MELGAREJO; PÉREZ et al., 1997). Outros pesquisadores relatam que as lectinas estão presentes no citoplasma e associadas à parede celular (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991). Parte das leguminosas e sementes contém isolectinas, que são formas moleculares múltiplas da lectina que exibem diferenças nas propriedades biológicas e estruturais: especificidade de carboidratos, mudanças na sequência de aminoácidos (LIS; SHARON, 1990). Lectinas são proteínas que, quando incorporadas em membranas polissacarídicas, podem preservar suas atividades biológicas (GEMEINER et al, 2009).

3.5.1 Lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA)

A Concanavalina A (ConA) é uma lectina extraída de *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecido como feijão-de-porco e amplamente estudada como sistema modelo no entendimento da base molecular do reconhecimento protéico por carboidratos (CORREIA et al., 2008). Esta lectina constitui o grupo de proteínas que se ligam a carboidratos, diferindo entre elas na estrutura molecular, especificidade ao carboidrato ligante e na atividade biológica, com origem vegetal, pertencente à família das lectinas de leguminosas, que se liga especificamente às unidades α -D-manose e α -D-glicose de carboidratos complexos. Sua estrutura molecular (REEKE et al., 1975), é composta por duas subunidades idênticas de 237 resíduos de aminoácidos, de 26.000 g/mol cada uma. Ela se apresenta como dímero em pH 4,5 a 6,0, e em pH maior que 7, é predominantemente um tetrâmero (DAM; BREWER, 2002). O reconhecimento dos carboidratos por ConA ocorre através de ligações do tipo pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos polares e os átomos de oxigênio do anel glicosídico. Além disso, para a ConA se ligar aos açúcares, dois íons metálicos, Mn^{2+} e Ca^{2+} , devem estar presentes no meio (LORIS et al., 1998).

A possibilidade de se distinguir as forças intermoleculares entre ConA e diferentes receptores foi estudada por microscopia de força atômica, medindo-se forças de adesão entre ConA e as glicoproteínas imobilizadas arilsulfatase A e carboxipeptidase A, e entre ConA e a superfície de células de carcinoma da próstata. Esses sistemas se mostraram promissores na investigação das alterações na expressão de glicoproteínas de membrana celular nos diferentes tipos de câncer (LEEKA et al., 2004).

A ConA destaca-se no uso para resolução do processo inflamatório, observando-se a liberação de histamina em mastócitos (LOPES et al., 2005), atividade antiinflamatória (CECHINEL et al., 2001) e estimulação mitogênica de linfócitos (MACIEL et al., 2004). Devido à alta especificidade, elas possuem aplicações na determinação de tipos sanguíneos, reconhecimento de carboidratos de superfícies celulares, detecção de cromossomos defeituosos e nos diagnósticos de câncer e imunodeficiências (SHARON; LIS, 2004).

Por ter sido a primeira lectina isolada, a ConA tem estrutura e propriedades bem caracterizadas (SHARON; LIS, 2004), e estudos de imobilização dessa biomolécula vêm sendo realizados. Trabalhos relatam adsorção de ConA sobre membranas automontadas de manose sobre ouro, foi descrito pelo modelo de Langmuir (ZHANG et al., 2006).

A semelhança entre as lectinas ConA e Cramoll 1,4 caracteriza-se por elas possuírem a mesma especificidade de ligações aos tipos de carboidratos, portanto a ConA, Cramoll 1,4 e Cramoll 3 conjugadas com peroxidase foram usadas em histoquímica para avaliação de alterações

na glicosilação em processos de diferenciação celular em tecidos de próstata humana : normal (NP), hiperplasia (BPH) e de carcinoma de próstata (ACP), estas lectinas comportaram-se como candidatos para sondas histoquímicas para patologias da próstata (LIMA et al., 2010).

O uso terapêutico de lectinas no processo de reparação do tecido ainda é pouco estudado, Yasuoka et al. (2003) utilizado lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA) em úlceras intestinais induzidas por indometacina em ratos, observaram uma reparação tecidual mais rápida nos animais tratados com lectinas.

A ConA é uma lectina que apresenta diversas ações tais como antitumoral, mitogênica e indutora da atividade cicatrizante (NILSON, 2007). Clinicamente e para efeitos didáticos, costuma-se estudar o processo cicatricial em três etapas: 1, fase Inflamatória; 2, fase de Fibroplasia e 3, fase de Contração (ROBBINS, 2005). Estudos têm demonstrado o perfil imunomodulatório de ConA, como caracterização de tecidos cancerígenos humanos (MELO et al., 2010).

3.6 Processo de cicatrização

Dentre os tecidos epiteliais de maior importância encontra-se a pele, considerada o maior órgão do corpo, recobrendo toda a sua superfície externa. A pele pode ser considerada como primeira linha de defesa do organismo, constituindo uma barreira mecânica, promovendo proteção imunológica, termorregulação e secreção. Esta estrutura é dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme que estão firmemente unidas entre si (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). A hipoderme camada subcutânea, situada abaixo da derme tem a mesma origem embrionária da derme, esta aumenta o isolamento da pele e é responsável pela união da pele com os órgãos adjacentes e a protege das lesões causadas por pressão ou estiramento (DE ALMEIDA, 2009).

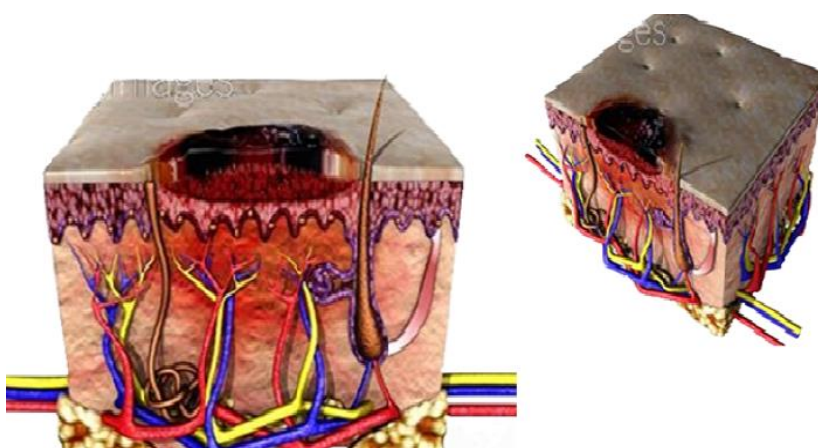
Os colágenos pertencem a uma família de proteínas da matriz extracelular (MEC) que desempenha um papel importante na manutenção da estrutura de vários tecidos e também possuem outras importantes funções, como por exemplo: adesão celular, quimiotaxia, migração (HEINO et al., 2009). Alguns colágenos são restritos em determinados tipos de tecido: por exemplo, tipo II e X e XI são exclusivamente encontrado nas cartilagens; a família do tipo IV nas membranas basais; e tipo XVII nos hemidesmossomas da pele. Por outro lado, alguns tipos de colágenos são encontrados na maioria das MECs. As fibrilas do colágeno frequentemente consistem de mais que um tipo de colágeno (MYLLYHARJU et. al., 2004).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e remodelamento MEC com objetivo de reparar tecido lesionado. Por sua vez, o tratamento de feridas busca o fechamento rápido da lesão de forma a restabelecer a integridade do

tecido lesionado. Diante disso é imprescindível a compreensão do processo biológico da cicatrização de feridas e regeneração tecidual (MENDONÇA, 2009).

Uma ferida pode ser definida como qualquer lesão que leve a uma descontinuidade cutânea (Fig 5), existindo várias causas, entre as quais as mais frequentes são: o trauma (mecânico, físico ou químico), a isquemia, a pressão no local e devido a procedimentos cirúrgicos (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Figura 5 – Esquema de uma lesão cutânea



FONTE: Disponível em Banco de Imagens Free:(http://www.istockphoto.com/stock-photo-14356732-scraped-knee.php?esource=SXC_Premium_Search_Top) Acesso em 03 de dezembro de 2013.

Diferentes tipos de células, matriz extracelular, proteínas e seus receptores estão envolvidos no processo biológico da cicatrização, o qual é mediado por citocinas e fatores de crescimento. A liberação de vários fatores de crescimento na ferida, como fator de crescimento derivado plaqueta-PDGF, fator de crescimento epidérmico-EGF, fator de crescimento básico de fibroblastos-FGF, fator de crescimento transformante beta-TGF- β 1, e o fator de crescimento transformante alfa-TGF- α , afetam o recrutamento, a ativação, a migração e a diferenciação de células no leito da ferida (FERREIRA et al., 2008).

Ackermann (2007) dividiu o reparo em três fases sobrepostas no tempo: (1) inflamação, (2) formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e (3) remodelação (Figura 6). O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como uns de seus mais importantes protagonistas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

3.6.1 Fase inflamatória

A pele lesada apresenta ruptura dos vasos sanguíneos e conseqüente sangramento. Os eventos iniciais do processo de reparo estão voltados para o tamponamento destes vasos. Quase imediatamente após a injúria ocorre agregação plaquetária e liberação de mediadores químicos solúveis, entre eles o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), iniciando a cascata da cicatrização. Vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, ativação do sistema complemento, migração de polimorfonucleares (PMN) e de macrófagos para o leito da ferida são características da hemostasia que precede a fase inflamatória. Em seguida, surgem os sinais clássicos que dão nome à fase – calor, rubor, edema e dor (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

As plaquetas continuam liberando mediadores químicos, proteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator Von Willebrand VIII) e fatores de crescimento (PDGF, TGF- α , TGF- β , EGF e FGF) o que estimula a ativação de outras plaquetas formando o coágulo que interrompe o sangramento (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; METCALFE; FERGUSON, 2007). O coágulo, além de limitar a perda de constituintes circulatórios, fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

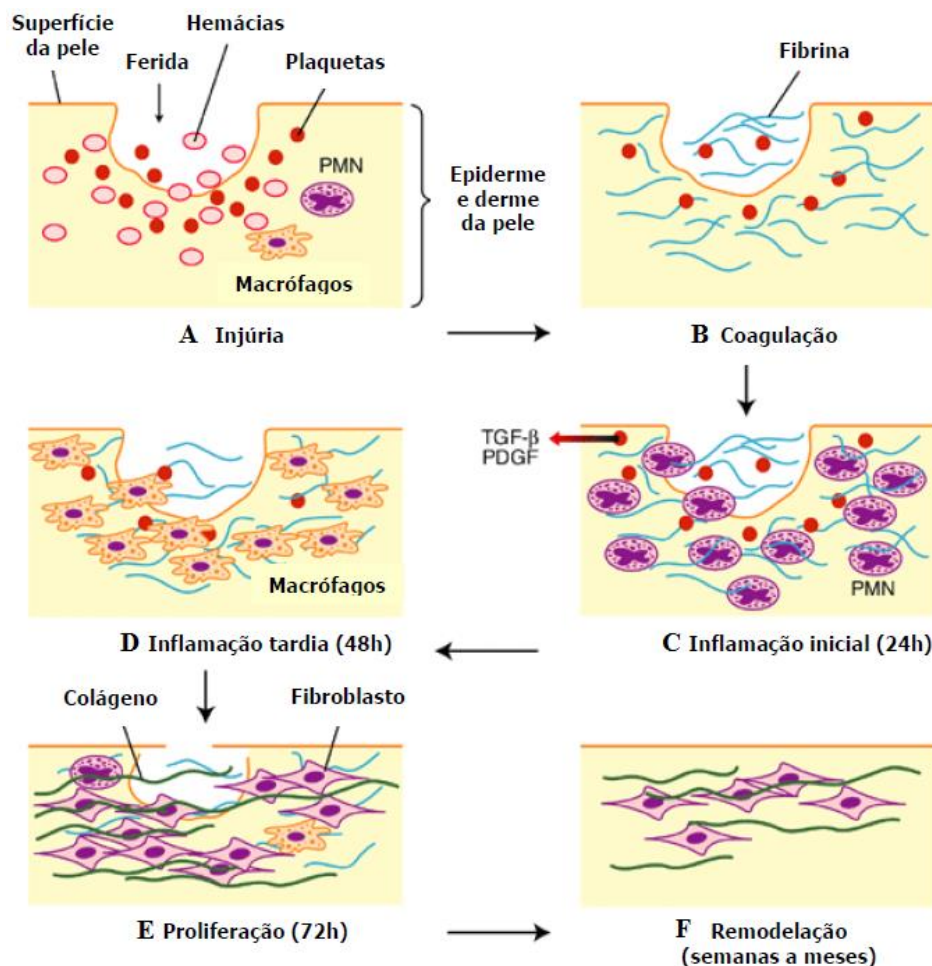
Na fase inflamatória os neutrófilos convergem para a área da ferida cujos números crescentes atingem o auge nas primeiras 24 a 48 horas. Para assumir o lugar dos neutrófilos em número decrescente pelo combate aos microrganismos, surgem os macrófagos, recrutados ao leito úlceral pelos mediadores químicos liberados (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; METCALFE; FERGUSON, 2007).

Os macrófagos são grandes células derivadas de monócitos e desempenham um papel decisivo na indução do processo de reparo. Além de auxiliarem os neutrófilos na eliminação de bactérias eles fagocitam o tecido necrótico promovendo o desbridamento da ferida. Os sinalizadores químicos produzidos por eles atraem mais macrófagos para o local e intensificam a migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e as células endoteliais promovem a angiogênese. Adicionalmente, os macrófagos produzem fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento endotelial vascular. Tantas propriedades essenciais tornam o macrófago um elo de transição entre a fase inflamatória e a proliferativa (BRADLEY et al., 1999; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; METCALFE; FERGUSON, 2007).

Segundo Beanes et al. (2003) (A) Imediatamente após a injúria, vasos sanguíneos danificados extravasam elementos sanguíneos e aminas vasoativas para dentro da derme. A

permeabilidade vascular é temporariamente aumentada para permitir que neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), plaquetas e proteínas plasmáticas infiltrem a ferida. Em seguida ocorre vasoconstrição em resposta aos fatores liberados por estas células. (B) Ocorre a coagulação do agregado plaquetário com fibrina que é depositada na ferida após a conversão do fibrinogênio. (C) As plaquetas liberam vários fatores, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante β (TGF- β), que atraem PMNs para a ferida, sinalizando o início da inflamação. (D) Após 48 horas, macrófagos substituem os PMNs tornando-se a principal célula inflamatória. Juntos, PMNs e macrófagos removem debris da ferida, liberam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da matriz extracelular. (E) A fase de proliferação inicia por volta de 72 horas com os fibroblastos, recrutados para a ferida por fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias, iniciando a síntese de colágeno. (F) Embora a taxa de síntese de colágeno desacelere após cerca de três semanas, a reticulação e reorganização do colágeno ocorrem por meses após a injúria na fase de remodelação do reparo (Figura 6).

Figura 6 – Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas



FONTE: Adaptado de Beanes et al. (2003).

3.6.2 Fase proliferativa

A segunda fase caracteriza-se por reepitelização, neo-angiogênese, deposição de matriz e síntese de colágeno (DOUGHTY; SPARKS-DEFRIESE, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Uma vez que já existe uma matriz provisória formada por fibrina, fibronectina e colágeno tipo V, esta serve de alicerce que possibilita a migração de queratinócitos e a reepitelização do leito da ferida. Esta migração ocorre a partir de apêndices remanescentes de pele, como as bordas da ferida e os folículos pilosos. Receptores de integrinas, fatores de crescimento e metaloproteinases (MMP) matrizes também estão envolvidos na migração dos queratinócitos. Tais MMPs degradam o colágeno tipo IV e rompem a aderência dos queratinócitos às fibras colágenas possibilitando que avancem pelo leito ulceral (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). As células que migram em direção ao leito da ferida formam uma única camada celular. Este processo é limitado a uma distância de três centímetros da borda da ferida e pode ser retardado caso haja tecido necrótico em seu trajeto. As células da primeira camada formada sofrem divisão mitótica originando camadas adicionais. Este novo tecido é bastante frágil e vulnerável à dessecação e à ruptura (BRADLEY et al., 1999; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Cerca de quatro dias após a injúria, inicia-se a reconstituição dérmica, com o acúmulo de fibroblastos, formação do tecido de granulação e de novos arcos capilares (neo-angiogênese). Neste momento, o fibroblasto passa a predominar no leito da ferida, sintetizando colágeno e uma matriz extracelular provisória rica em fibronectina, elastina e proteoglicanos. Este tecido conectivo sustenta as novas células e os frágeis arcos capilares (DOUGHTY; SPARKSDEFRIESE, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Segundo os mesmo autores, os fibroblastos também sofrem diferenciação em miofibroblastos, células pouco proliferativas e com grande concentração de miofibrilas contráteis, assemelhando-se às células do músculo liso. Assim modificados, podem participar da contração da ferida.

Mediante a ação do fator de crescimento derivado de plaquetas 1 (PDGF1), 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vassopressina, epinefrina e norepinefrina, as células do leito da ferida se alinham aos miofibroblastos e uma contração unificada ocorre na direção das linhas de tensão da pele, exigindo para isso contato célula-célula e célula-matriz (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

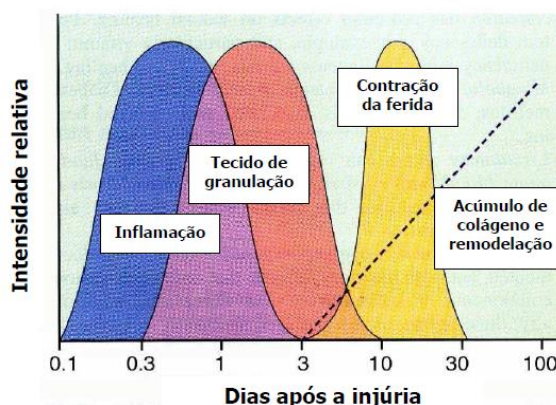
A baixa tensão de O₂ e o alto conteúdo de ácido láctico presentes no leito da ferida juntamente com fatores de crescimento endoteliais vasculares secretados pelos queratinócitos estimulam a neo-angiogênese que diminui à medida que a oxigenação local aumenta (DOUGHTY; SPARKS-DEFRIESE, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

3.6.3 Remodelamento

Por volta do décimo dia, o preenchimento do leito da ferida por tecido de granulação está completo (VITORINO FILHO et al., 2007), e este é servido por uma rede capilar e uma rede linfática em regeneração acelerada, devido a sua reconstrução ter início posterior ao da vasculatura. À medida que mais fibras colágenas vão sendo depositadas no tecido de granulação, este vai se assemelhando a uma massa fibrótica característica de cicatriz. As primeiras fibras de colágeno tipo I surgem nesta etapa e este é o tipo de colágeno predominante no tecido conjuntivo denso, sempre formado feixes de fibras (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fase final do processo de cicatrização envolve diminuição da atividade celular e etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; HOSGOOD, 2006). Ocorre o aumento da produção de collagenase para digerir o acúmulo excessivo de colágeno, regressão da exuberante rede de capilares e aumento da resistência do tecido neoformado (DOUGHTY; SPARKS-DEFRIESE, 2007) devido à reorganização das fibras. Este processo ocorre no decorrer de meses ou anos (Figura 7) e a cicatriz madura alcança apenas 70% da força tênsil da pele normal (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Figura 7 – Fases ordenadas da cicatrização de feridas, em função do tempo



FONTE: Adaptado de Francischetti et al. (2009). A cicatrização de feridas é dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelação. A proliferação é uma etapa crítica do processo e é caracterizada por uma intensa multiplicação de células endoteliais, acúmulo de fibroblastos e síntese de colágeno. O processo necessita de nutrição, oxigênio e suporte físico para o crescimento tecidual.

3.7 Avaliação do processo cicatricial

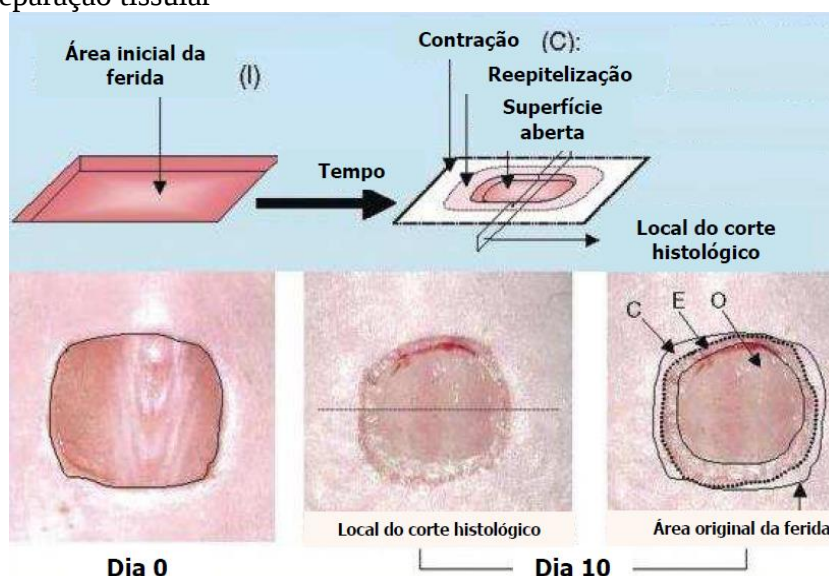
Dentre os métodos utilizados para avaliar de maneira sistemática a cicatrização de feridas, os mais utilizados são as avaliações clínica, morfométrica e histológica (TYRONE; MARCUS; BONOMO, 2000; LOPES et al., 2005; GUL et al., 2007).

3.7.1 Avaliação clínica

A avaliação clínica das feridas é o principal método utilizado para avaliar a reparação tissular fundamentando-se no exame macroscópico da lesão. Considerando que é possível inferir em que fase da evolução do processo cicatricial a lesão se encontra, é possível fazer uma correlação entre o que foi observado e o tempo da instalação da injúria, e entre os achados e as análises microscópicas (HOSGOOD, 2006; LIMA, 2010).

Durante a fase inflamatória da cicatrização, observa-se macroscopicamente em feridas abertas, a presença de um coágulo sanguíneo e exsudato serossanguinolento ou purulento (LIMA, 2010). Macroscopicamente, a fase proliferativa é marcada pela visualização do tecido de granulação, que pode assumir aspecto variável, desde avermelhado e exuberante a róseo, esbranquiçado, granular nodular, de acordo com a quantidade de colágeno e vasos sanguíneos neoformados. Observa-se também a contração da ferida entre o quinto e o nono dias após o trauma, com notável redução do seu diâmetro (Figura 8). É necessário ressaltar que a taxa de contração depende da localização anatômica da ferida e a flexibilidade do tecido adjacente. Segundo De Nardi et al. (2004), Gul et al. (2007), Lima (2010), Martins et al. (2006) ainda nessa fase tem início a reepitelização, evidenciada pela presença de tecido róseo íntegro localizado nas bordas da lesão (Figura 8).

Figura 8 – Análise do fechamento de ferida. Fotografias padronizadas da evolução do processo de reparação tissular



FONTE: Adaptado de Scherer et al. (2008). Contração da ferida (C), reepitelização (E) e superfície aberta (O) que foi avaliada como um percentual da área inicial da ferida (I).

3.7.2 Avaliação morfométrica

A mensuração da área da ferida é um dos aspectos fundamentais na avaliação do processo cicatricial. Esta informação fornece, de maneira objetiva, parâmetros que indicam a melhora ou piora da cicatrização (NIX, 2007).

A mensuração bidimensional é a mais simples, rápida e mais utilizada na prática clínica, não requer equipamento especializado e abrange medições lineares, traçados e fotografias das feridas. As medidas lineares determinam o tamanho ou a área das feridas, multiplicando-se o comprimento pela largura, a fim de estabelecer um parâmetro comparativo entre a medida inicial e as demais obtidas durante a evolução do processo. Dessa forma torna-se possível a determinação da taxa de contração da lesão (GOMES, 2009).

O paquímetro é a ferramenta mais utilizada por pesquisadores para determinação da área da ferida, sendo que os paquímetros digitais são os mais empregados atualmente por conferirem medida mais determinada do diâmetro da lesão (GUL et al., 2007; MENEZES; COELHO; LEÃO, 2008; LIMA, 2010).

3.7.3 Avaliação histológica

Segundo Lima et al. (2010) a análise histológica da ferida é empregada especialmente em associação à avaliação clínica do processo cicatricial, e essa inter-relação confere maior credibilidade aos resultados. A coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) é utilizada rotineiramente para a análise microscópica das diferentes fases do processo de reparação tecidual (MARGULIS et al., 2007). Alguns componentes específicos nas diferentes etapas de reparo tissular necessitam de outros métodos de coloração, como o Tricrômico de Masson e Picrossírius (EULÁLIO et al., 2007; SEZER et al., 2007). A coloração Tricrômico de Masson é um método de coloração consagrado, utilizado em inúmeras pesquisas científicas e possibilita a visualização de fibras colágenas e musculares, corando as primeiras de azul claro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Microscopicamente, a presença de exsudato na incisão é normal nas primeiras 48 a 72 horas. Após esse período, a exsudação é sinal de prejuízo à cicatrização (BATES-JENSEN, 1998). Quando persiste o exsudato, ocorre desagregação da crosta favorecendo o desenvolvimento de microrganismos entre ela e o tecido de granulação (OLIVEIRA, 1992). Cerca de seis horas após o trauma, a margem da ferida contém fagócitos, e por volta de 24 horas o coágulo já está invadido por estas células, com predomínio dos neutrófilos. Com 48 horas o número de neutrófilos diminui sensivelmente, passando o exsudato a ser constituído predominantemente por macrófagos

(VITORINO FILHO et al., 2007).

Na fase proliferativa, o tecido de granulação invade progressivamente o espaço incisional. No quinto dia, este espaço é preenchido por tecido de granulação. O colágeno inicialmente é escasso e se cora fracamente. A quantidade de colágeno aumenta com o tempo e por volta de duas semanas suas fibras passam a predominar na matriz extracelular (VITORINO FILHO et al., 2007). O colágeno tipo III é o primeiro a surgir na ferida e caracteriza-se como colágeno jovem ou imaturo e confere aspecto desorganizado às fibras (RICH; WHITTAKER, 2005). Treze dias após a lesão é nítida a retração da ferida cuja função é atribuída aos miofibroblastos (VITORINO FILHO et al., 2007).

Na fase de remodelamento, o colágeno tipo I, maduro, substitui o tipo III em cicatrizes antigas e se caracteriza pela maior organização das fibras colágenas (RICH; WHITTAKER, 2005). Quando a ferida se fecha, o número de células dos vasos sanguíneos e de miofibroblastos diminui. Isto se deve ao fenômeno denominado apoptose ou morte celular programada, pelo qual o tecido de granulação evolui para a cicatriz (DESMOLIERE et al., 1995).

3.8 Proteômica

A identificação de genes tem contribuído para a compreensão dos mecanismos no processo de cicatrização. Contudo, mudanças transcricionais não refletem a expressão de proteínas (GYGI et al., 1999), uma vez que processos pós-transcricionais, alterando a quantidade de proteína ativa, como a síntese, modificação e a degradação de proteínas, não são levadas em consideração, podendo haver um aumento drástico no proteoma sem um aumento comitente da expressão gênica. Assim, abordagens complementares como o estudo de proteomas podem ajudar a identificar as proteínas relacionadas neste processo (CHEN; HARMON, 2006).

A proteômica surgiu quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975). O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians, em 1994, como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento proteico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS et al., 1996). Depois da repercussão provocada pelo sequenciamento do genoma de vários organismos, pesquisadores perceberam que, para se compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. Verificou-se que, apesar de importante, a análise das sequências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI et al., 1999).

Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber se um gene está sendo expresso, isto é, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. A análise proteômica pode mostrar também como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (GALDOS, 2009).

Inicialmente, o objetivo dos estudos proteômicos foi identificar em larga escala todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Estudos tratavam na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intento de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão proteica (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

As razões que justificam tal magnitude do proteoma são as variações na clivagem do RNA e as modificações pós-traducionais, que o torna várias vezes maior e complexo que o genoma correspondente. Modificações na quantidade das proteínas com o tempo, com o desenvolvimento do organismo e as alterações do meio ambiente, tornam este desenvolvimento dinâmico (WILKINS et al., 1996).

Uma vez que as análises realizadas através do DNA e da sequência do RNAm por si só não determinam as propriedades dos sistemas biológicos, a análise do proteoma é uma ferramenta de apoio conceitualmente atrativa, pois atrelada a estudos genômicos e transcriptômicos, podem fornecer dados que complementem a determinação de tais propriedades. Estas incluem a quantidade de expressão da proteína, a localização subcelular, o estado de modificação, e a associação com ligantes, bem como a taxa de variação com o tempo (GYGI et al., 1999).

Uma das técnicas de proteoma mais utilizada é a 2D-PAGE, acoplada a espectrometria de massas. No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2D-PAGE é um método de escolha, e gera dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual, para amostras pouco complexas, e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2010). Esta técnica permite a separação, a visualização e a quantificação de proteínas reproduzidas sobre um gel único (KLOSE; KOBALZ, 1995; O'FARELL, 1975).

Com os recentes avanços, como o aumento da reprodutibilidade pelo uso de gradientes imobilizados de pH, a visualização de imagens e aumento de sensibilidade de detecção; devido ao incremento de tecnologias utilizando fluorescência e nas análises por espectrometria de massas, como o aumento de sensibilidade, resolução e velocidade de aquisição de dados de identificação de

proteínas para um nível que permite a análise em larga escala de proteínas separadas por eletroforese bidimensional (2-DE), a proteômica tem se tornado uma estratégia alternativa no estabelecimento de marcadores bioquímicos e uma das mais utilizadas para análises metabólicas e de expressão gênica global (SHEVCHENKO et al., 1996; PAWLOWSKI, 2007).

A eletroforese bidimensional apresenta também limitações, como baixa sensibilidade de detecção de proteínas em baixa concentração, dificuldades na resolução de spots das proteínas com pontos isoeletricos e massas moleculares e parecidos e pouca representação das proteínas hidrofóbicas. No entanto, repetições de géis, meticulosidade nas análises e aplicação de protocolos mais específicos para recuperação de proteínas com baixa solubilidade tem feito com que estas dificuldades venham sendo superadas (SANTONI et al., 2000; GÖRG et al., 2004). O uso de compostos fluorescentes e de softwares de análise de imagens de géis tem proporcionado resultados que permitem melhores interpretações de dados (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003; TANNU; HEMBY, 2006; VISWANATHAN et al., 2006).

A proteômica tem sido usada no estudo de vários organismos com diversos propósitos, como análise do perfil proteico para correlação filogenética, estudo das proteínas de membrana para resolução das interações proteína-proteína, estudo de isoformas, resposta a diversas condições fisiológicas, doenças, detecção de modificações pós-traducionais, proteoma mitocondrial e nuclear (LIEBLER, 2002).

Não foram encontrados, até o momento registros na literatura de que xiloglucanas obtidas a partir de *H. courbaril* var *courbaril* tenham sido utilizadas como material polimérico na obtenção de membranas incorporadas com ConA para liberação de fármacos. Baseado nessas considerações, a avaliação da possibilidade da xiloglucana extraída de sementes de *H. courbaril* ser usada como material polimérico na obtenção de membranas merece especial atenção. O presente trabalho apresenta a extração e caracterização da xiloglucana de sementes de *H. courbaril*, a incorporação de ConA em membranas deste polissacarídeo para avaliar o seu efeito cicatrizante, com potencial de utilização como curativo tópico, para promover a cicatrização.

4. Referências Bibliográficas

ABHYANKAR, A. R. et al. Techniques for localisation of konjac glucomannan in model milk protein–polysaccharide mixed systems: Physicochemical and microscopic investigations. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1362–1368, 2011.

ABRUZZO, A. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 581-588, 2012.

ACKERMANN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis veterinary disease**, Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. p.101-191.

AUDIC, J.L.; CHAUFER, B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable Membranass made from sodium caseinate. **European Polymer Journal**, v.41, p. 1934-1942, 2005.

AVACHAT, A. M.; GUJAR, K. N.; WAGH, K V. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 537– 542, 2013.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1989.

BARRA, G. **Fundamentos da Reologia de Materiais Poliméricos**. Apostila de processos 4. EMC 5744. Disponível em: <<http://emc5744.barra.prof.ufsc.br/Reologia%20parte%201.pdf>>. Acesso em 18 de dezembro de 2013.

BATES-JENSEN, B.M. Management of exsudate and infection. In: SUSSMAN, C.; BATESJENSEN, B.M. **Wound care: a collaborative practice manual for physical therapists and nurses**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1998. p.159-177.

BEANES, S.R. et al. The phases of cutaneous wound healing. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, n.21, 2003.

BEER, H.D.; FASSLER, R.; WERNER, S. Glucocorticoid regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitam Horm**, v. 59, p. 217-239, 2000.

BERGSTROM, E. M. et al. Plasticized xyloglucan for improved toughness - Thermal and mechanical behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2532– 2537, 2012.

BOURBON, A. I. et al. Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 111–118, 2011.

BRADLEY, M. et al. Systematic reviews of wound care management: (2) dressings and topical agents using in the healing of chronic wounds. **Health Technology Assessment Journal**, v.3, n.17, p.1-35, 1999.

BUCKERIDGE, M. S. et al. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 233-237, 1997.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v.154, p. 1017–1023, 2010.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C.; LIMA, D.U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: GUPTA, A.K.; NAUR, N. **Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation**, São Paulo: Elsevier Science B. V., 283-316, 2000.

BUSATO, A. P. et al. New 4-O-substituted xylosyl units in the xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 277–282, 2005.

BUSATO, A. P. et al. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Materials Science and Engineering C**, 29, 410–414, 2009.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 525–531, 2011.

CARVALHO FILHO J.L.S. et al. Produção demudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **CERNE**, v. 9, n. 1, p. 109–118, 2003.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of Diocleinae Subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 123-135. 2001.

CECHINEL, Y. M. N. et al. A. Evaluation of anti-inflammatory activity from *Cratylia mollis* lectin in mice. In: VI Pharmatech III Annual Meeting of the SBTF. VI Pharmatech III Annual Meeting of the SBTF, 2001. Recife-PE v.01, p.167-168. 2001.

CERQUEIRA, M. A. et al. Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: Functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. **Food Research International**, v. 43, p. 2031–2038, 2010.

CERQUEIRA, M. A. et al. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films e A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p.175 – 184, 2012.

CERQUEIRA, M. A. et al. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, 83, 179–185, 2011.

CERQUEIRA, M.A. et al. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, 75, 408-414, 2009.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504- 5516, 2006.

CHOPIN, T.,; WHALEN, E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydrate Research**, 246, 51-59, 1993.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectins genes and their role in plant defense. *Plant Cell*, v. 3, p. 1-9. 1991.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. In: *Recent Trends in Toxicology*, Transworld Research Network, 2008.

COVIELLO, T. et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. ***Journal of Controlled Release***, v. 119 p. 5–24, 2007.

CULLITY, B.D. ***Elements of X-ray diffraction***. 2 ed. Addison-Wesley Publishing Company, INC., 1978, 555p.

CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A.; Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. ***Química Nova***, v. 32, n 3, p. 649-660, 2009.

DAKIA, P.A. et al.. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. ***Food Hydrocolloids***, v. 22, p. 807–818, 2008.

DAM, T. K. e BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. ***Chemical Reviews***, v. 102, n. 2, p. 387-429, 2002.

DE ALMEIDA, P. C. C. ***Estudo da transicao dermoepidermica dos enxertos de pele e sua relacao como surgimento de vesiculas***. Sao Paulo. Tese, Faculdade de Medicina de Sao Paulo, pp. 133, 2009.

DE MELO, C.M.L. et al. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice, ***Scand J Immunol***, v. 73, n.2, p. 112-21, 2011.

DE NARDI, A.B. et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitamina A e E, lecitina de soja e iodopolivinilpirrolidona em cães. ***Arquives of Veterinary Science***, v.9, n.1, p.1-16, 2004.

DIXIT, R. P.; PUTHLI, S. P. Strip thechnology: Overview and future potential. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 139, p. 94-107, 2009.

DOUGHTY, D.B.; SPARKS-DEFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds: current management concepts**. 3 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p.56-81

DUCKE A. As espécies brasileiras de jatahy, jutahy ou jatobá (gênero Hymenaea L., leguminosas cesalpiniaceas). **Annaes da Academia Brasileira de Sciencias**, v.7, n 3, p.203–212, 1935.

EULÁLIO, J.N. et al.A influência da calcitonina sintética do salmão na cicatrização cutânea de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, n.4, p.237-244, 2007.

FERREIRA A.S., et al. Measurement of healing area using planimetry after applying low-intensity ultrasound to the skin of rats. **Revista Brasileira Fisioterapia**, v. 12, n. 5, p. 351-8, 2008.

FERREIRA, E. et al. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.37, n.1, p.44-51, 2003.

FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1980.

FOUGÈRE-DANEZAN ,M. et al. Morphological evolution in the variable resin-producing Detarieae (Fabaceae): do morphological characters retain a phylogenetic signal? **Annals of Botany**, v. 105, n 2: 311–325, 2010.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v.14, 2009.

FREITAS, R. A., et al. Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p.1636–1642, 2011.

FREITAS, R. A., et al. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507–514, 2005.

FURTADO, R. F. et al. A novel xyloglucan film-based biosensor for toxicity assessment of ricin in castor seed meal. **Carbohydrate Polymers**, v.89, p.586– 591, 2012.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GEMEINER, P., D. MISLOVICOVA, J. TKAC, J. SVITEL, V. PATOPRSTY, E. HRABAROVA, G. KOGAN, T. KOZAR, *Biotechnol. Adv.*, 27 (2009)

GODBILLOT, L. et al.. Analysis of water binding in starch plasticized films. **Food Chem.**, v.96, n.3, p. 380-386, 2006.

GOMES, F.S.L. **Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica fase I**. Belo Horizonte, 2009. 270p. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Universidade Federal de Minas Gerais.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, EV.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, 25, 1514-1520, 2011.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p.3665-3685, 2004.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v.88, p.547– 557, 2012

GUL, N. Y. et al. The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser in wound healing in rabbits. **Veterinary Dermatology**, v.19, n.1, p.7-14, 2007.

GYGI, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v.40, p. 139–168 1989.

HEINO, M.; HUHTALA, J.; KAPYLA, J.; JOHNSON, M.S. A evolucao dos sistemas de adesao a base de colageno. **International Journal of Cell Biology and Biochemistry**, v.41, p.341-348, 2009.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.36, n.4, p.667-685, 2006.

JÓ T. A. et al Xyloglucan nano-aggregates: Physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug. **Carbohydrate Polymers** v.82, p. 355–362, 2010.

JONES, D.S.; MEDLICOTT, N.J. Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. **Int. J. of Pharm.** v.114, p. 257-261, 1995.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KAHN, H. **Difração de Raios X**. Disponível em: <http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf>. Acesso em 19 de dezembro de 2013.

KAI, K. C.; PETKOWICZ, C. L. O, Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 223–228, 2010.

KAI, K. C.; PETKOWICZ, C. L. O, Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 223–228., 2010.

KAUR, H. et al. N. (2012). Synthesis, characterization and evaluation of thiolated tamarind seed polysaccharide as a mucoadhesive polymer. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1543– 1549.

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

KFURI, C. R. **Revestimento gastro-resistente em comprimidos de diclofenaco sódico pelo processo de leito de jorro fluidizado.** 2003. Mestrado em Ciencias Farmaceuticas. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, São Paulo.

KLOSE, J.; KOBALZ, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**, v.16, n. 1, p. 1034–1059, 1995.

KOCHUMALAYIL, J. J. Regioselective modification of a xyloglucan hemicellulose for high-performance biopolymer barrier films. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, p. 466– 472, 2013.

KOMPELLA, U. B.; LEE, V.H.L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide. 2001

KWEON, D.K. et al. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v.24, n.9, p.1595-601, 2003.

LANGENHEIM JH, et al. Evolutionary implications of resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae:Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 69, n.4, p. 595–607, 1982.

LEE Y-T, LANGENHEIM, JH. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae,Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany**, v. 69, p. 1–109, 1975.

LEEKA, M. et al. Probing molecular interaction between concanavalin A and mannose ligands by means of SFM. **European Biophysical Journal**, v. 33, p. 644–650, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de bioquímica.** 4a. ed. São Paulo: Sarvier, 2006, 1202 p.

LEWINSOHN TM. **Predação de sementes em Hymenaea L. (Leguminosae: Caesalpinoideae): aspectos ecológicos e evolutivos.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de mestrado, 1980.

LEWIS G, SCHRIRE B, MACKINDER B, LOCK M (eds.). 2005. **Legumes of the World.** Kew:Kew Publishing.

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

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tool for the new biology.** 1. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press. p. 198, 2002.

LIMA, A.L.R. et al Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with Cratylia mollis Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.**..2010

LIMA, C.R.O. **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana.** Goiânia, 2010. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás.

LIMA, H.C.; PINTO, R.B. 2013. Hymenaea in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22972>) Acesso em 03 de dezembro de 2013.

LIMA, N.N. et al. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17 n. 6, 413-415, 1995

LIMA, N.N, et al. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. Stilbocarpa (jatoba). **Carbohydr. Res. Brazil** v.45, n. 1, p.22-26, 1993.

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

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

LOPES, G.C.; et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wound in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, n.2, p.256-272, 2005.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1383, p. 9-36, 1998.

LUBAMBO, A. F. et al. Self-assembled polystyrene/xyloglucan nanospheres from spin coating evaporating mixtures. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p.126–132, 2011.

LUCYSZYN, N. et al. Chemical, physico-chemical and cytotoxicity characterisation of xyloglucan from *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard seeds. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 1242-1250, 2011.

LUCYSZYN, N., et al. Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 552–558, 2009.

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

MAHAJAN, H. S. Thiolated xyloglucan: Synthesis, characterization and evaluation as mucoadhesive in situ gelling agent. *Carbohydrate Polymers*, v. 91, p. 618– 625, 2013.

MARGULIS, A.; et al Comparison of topical iodine and silver sulfadiazine as therapies against sulfur mustard burns in a pig model. *Wound Repair and Regeneration*, Denmark, v.15, p.916-921, 2007.

MARTINS, E.F. et al. Influência da lanolina na cicatrização. *Saúde em Revista*, v.7, n.16, p.19-25, 2005.

MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; SOUZA B.W.S.; VICENTE, A.A. Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on

physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, 29, 280-289, 2012.

MARTINS, N.L.P.; et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phaletara* (Babaçu). Estudo comparativo em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n.3, p.66-75, 2006.

MATHLOUTHI, M.; KOENIG, J.L. Vibrational spectra of carbohydrates. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 44, 82-89, 1987.

MELGAREJO, L. M.; PÉREZ, G. Immunolocalization of the lectins P2 e P4 from *Dioclea lehmanni* seeds. *Plant Cell Physiology*, v. 38, p. 480-483. 1997.

MELO, C. L. M. 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, 2010.

MENDONCA, R. J., COUTINHO-NETTO, J. Cellular aspects of wound healing. *Anais da Academia Brasileira de Dermatologia*, v.84, n.3, p.257-62, 2009.

MENEZES, F.F.; COELHO, M.C.O.C.; LEÃO, A.M.A.C.; Avaliação clínica e aspectos histopatológicos de feridas cutâneas de cães tratadas com curativo temporário de pele. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.2, n.4, p1-3, 2008.

METCALFE, A.D.; FERGUSON, M.J.W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **Journal of the Royal Society Interface**, v.4, n.14, p.413-437, 2007.

MKEDDER, I. et al. Preparation and enzymatic hydrolysis of nanoparticles made from single xyloglucan polysaccharide chain. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 934– 939, 2013.

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

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal

films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 77, p. 187-199, 2011.

MUDGIL, D., Barak, S., & Khatkar, B. S. (2012). Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum. *Carbohydrate Polymers*, 90, 224– 228.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI. Colagenos, que altera as enzimas e as suas mutacoes nos seres humanos, moscas e vermes. *Tendencias Geneticas*, v.20, p.33–43. 2004.

NAGAR, P.; CHAUHAN, I.; YASIR, M. Insights into polymers: Film formers in mouth dissolving films. **Drug Invention Today**, v. 3, n. 12, p. 280-289, 2011.

NILSSON, C. L. Lectins: Analytical Tools from Nature. In: _____. *Lectinas Analytical Technologies*. 1.ed. Oxford:Elsevier. 2007. cap 1, p. 1-14.

NISHIMURA, M. et al. *In vitro* and *in vivo* characteristics of prochlorperazine oral disintegrating film. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 268, p. 98-102, 2009.

NIX, D.P. Patient assessment and evaluation of healing. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds: current management concepts**. 3 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. 674p. p.130-148.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, H.P. Traumatismos nos animais domésticos. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária**, v.1, n.7, p.1-57, 1992.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, v. 33, p. 311- 323, 2003.

PAWLOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and giberellic acids. **Proteomics**, v, 7, p. 2246-2257, 2007.

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

PINHEIRO, A. C. et al. Transport mechanism of macromolecules on hydrophilic bio-polymeric matrices – Diffusion of protein-based compounds from chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v.116, p. 633–638, 2013.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2064-2077, 2010.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v.6, p.41-75, 2004.

REEKE, G. N.; BECKER J. W.; EDELMAN, G. M. Covalent and 3-dimensional structure of concanavalin A. 4. Atomic coordinates, hydrogen-bonding and quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 4, p. 1525-1547, 1975.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.22, n.2, 97-104, 2005.

ROBBINS, S. L. et al., *Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional*. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.01-98, 2005.

ROSÁRIO M.M.T et al. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, p. 464–472, 2008.

RZAEV, M. O., PEKEL, N., SAHINER, N., GUVEN, O . Synthesis and characterization of N-vinylimidazole-ethyl methacrylate copolymers and determination of reactivity ratios. **European Polymer Journal**, v.37. p.2443- 2451. 2001.

SANTONI, V.; MOLLOY, M.; RABILLOUD, T. Membrane proteins and proteomics: an amour impossible? **Electrophoresis**, v. 21, p. 1054-1070, 2000.

SCHERER, S.S. et al. Wound Healing Kinetics of the Genetically Diabetic Mouse. **Wounds**, v.8, n.1, p.1, 2008.

SEGUNDO, A.S. et al. Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Periodontia**, v.17, n.1, p.5-10, 2007.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review**, v.56, p.1467-80, 2004.

SEZER, A.D. et al. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. **AAPS PHARMSCITHEC**, v.8, n.2, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R. 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochemistry**, v. 30. p. 59-75. 1995.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**. v. 68, p. 850-858, 1996.

SIEVENS-FIGUEROA, L. et al. Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 423, p. 496-508, 2012.

SKOOG, D.A et al.. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 8ª Edição 889-945(2006).

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, TIMOTHY. **Princípios de Análise Instrumental**. Editora Bookman, Porto Alegre, 5ª Edição 598-637 (2002).

SOUZA LIMA, M.M. **Polissacarídeos nativos e modificados das sementes de *Hymenaea courbaril***. 1997. Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TANG, M. et al. Preparation, characterization and properties of partially hydrolyzed ethylene vinyl acetate copolymer films for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 400, n. 1-2, p. 66-73, 2010.

TANNU, N. S.; HEMBY, S. E. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. **Nature Protocols**, v. 1, p 1732-1742, 2006.

TOSIN, F. F. S. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus persica*: caracterização estrutural e análises reológicas**. Tese (doutorado em bioquímica).Universidade Federal do Paraná. p. 130, 2008

TYRONE, J.W.; MARCUS, J.R.; BONOMO, S.R. Transforming growth factor α_3 promotes fascial wound healing in a new animal model. **Archives of Surgery**, v.135, n.10, p.1154-1159, 2000.

VALENGA, F. et al. Galactomannan thin films as supports for the immobilization of Concanavalin A and/or dengue viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.50, p. 88– 94, 2012.

VANIN, F.M. et al.. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocol.** v.19, p.899-907, 2005.

VISWANATHAN, S.; UNLU, M.; MINDEN, J. S. Two-dimensional difference gel electrophoresis. **Nature Protocols**, v. 1, p 1351-1358, 2006.

VITORINO FILHO, R.N.L.; et al.. Avaliação do uso de pomada à base de sementes de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) na terapêutica tópica de feridas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.3, p.279-286, 2007.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese. 2003.

WESTERMEIER, R; NAVEN, T. A laboratory manual of proteome analysis. **Proteomics in Practice**, p. 329, 2002.

WILKINS, M. R.; et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 61-65, 1996.

WORDS, K. Guide to Derivatization Reagents for GC. Supelco, Sigma-Aldrich 1-12(1997).

ZHANG, Y. *et al.* Carbohydrate-protein interactions by "clicked" carbohydrate self-assembled monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 2001-2008, 2006.

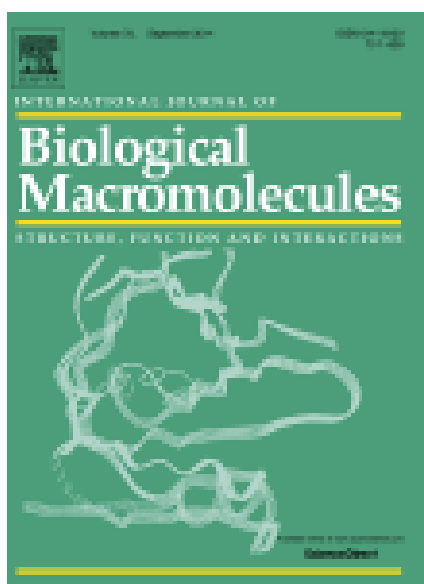
ZYKWINSKA, A. et al. Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 957–961, 2008.

YASUOKA, T. et al., "The Effects of Lectins on Indomethacin-Induced Small Intestinal Ulceration," *International Journal of Experimental Pathology*, V. 84, N. 5, , p. 231-237, 2003.

CAPÍTULO 1

Extraction and physicochemical characterization of the xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds

Artigo a ser submetido à revista International Journal of Biological Macromolecules



Fator de Impacto: 3.096

Extraction and physicochemical characterization of the xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds

Isabel R.S. Arruda ^a, Priscilla B.S. Albuquerque ^a, Gustavo R.C. Santos ^c, Alexandre G. Silva ^a, Paulo A.S. Mourão ^c, Maria T.S. Correia ^a, António A. Vicente ^{a,b}, Maria G. Carneiro-da-Cunha ^a

^aDepartamento de Bioquímica/Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP: 50.670-420 – Recife, PE – Brasil.

^bIBB–Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

^cLaboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Programa de Glicobiologia, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

* Corresponding author. Fax: +55-81-2126.8576; Tel.: +55-81-2126.8540

E-mail address: mgcc@ufpe.br (M. G. Carneiro-da-Cunha)

Abstract

The polysaccharide extracted from *H. courbaril* var *courbaril* seeds was efficiently extracted with 0.1 M NaCl followed by ethanol precipitation. The extraction yields presented results of η_e 71.71% $\pm$ 5 e η_p 81.05% $\pm$ 7. The amorphous structure and the xyloglucan characteristic peaks were obtained by X Ray and FTIR respectively, while the monosaccharide composition performed by GC/MS showed a relationship of Glucose:Xylose::Galactose:Arabinose (40:34:20:6). One- (1D) and two-dimensional (2D) NMR spectra confirmed the central backbone of the polysaccharide composed by 4-linked β -glucose units partially branched at position 6, with non-reducing terminal units of α -xylose and β -galactose. The xyloglucan solution was evaluated by DLS presenting a monodisperse and neutral profile, while by rheological analyzes the xyloglucan at 0.5 and 1.0% (w/v) concentrations behaves as a viscoelastic liquid. Antibacterial activity and significant hemolysis were not detected from the biological activities of the xyloglucan. The results indicate that xyloglucan proved to be a promising material in food and pharmaceutical industries and can be an alternative to commercial xyloglucans.

1. Introduction

Polysaccharides are polymers widespread in nature and available especially from plants and microorganisms. They are an endless source of biopolymers generally non-toxic, biodegradable, biocompatible and sometimes exhibit properties of biorecognition (Mkedder et al., 2013). The polysaccharides have a wide range of composition and physiochemical properties that cannot be easily reproduced synthetically. Thus, the ease of obtaining it from natural sources becomes numerous polysaccharides cheaper than synthetic polymers (Coviello, Matricardi, Marianecci, & Alhaique, 2007).

Xyloglucans are linear polysaccharides with side chains usually found in the primary cell walls and in the higher plants seeds with structural and storage functions, respectively. Its chemical structure is a (1 $\rightarrow$ 4)-linked β -D-glucan backbone, substituted at O-6 by α -D-xylose

branches and partially substituted in turn at O-2 by β -D-galactose units linked by hydrogen bonds (Freitas et al., 2005; Hayashi, 1989; Jó, Petri, Beltramini, Lucyszyn, & Sierakowski, 2010; Lucyszyn et al., 2009). Xyloglucans can be extracted from seeds of different species such as *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* and *Tamarindus indica* and their chemical structures vary according to the origin (Rosário, Kangussu-Marcolino, Amaral, Noletto, & Petkowicz, 2011).

Xyloglucans are water soluble polysaccharides, non toxics, which can form highly viscous solutions at low concentrations and in association with other polysaccharides, they form gels that control the structure and the texture of many commercial products (Ikeda et al., 2004; Temsiripong, Pongsawatmanit, Ikeda, & Nishinari, 2005; Lucyszyn et al., 2011; Suisha et al., 1998). With unique rheological properties, xyloglucans has potential use in food and medical industries (Maeda, Yamashita, & Morita, 2007), where they have use as tablets or capsules, hydrogels and films (Ribeiro et al., 2009; Lucyszyn et al., 2009; Rosário et al., 2011), enabling its use, for example, as a carrier system for controlled drug release (Ribeiro et al., 2009; Jó et al., 2010).

Hymenaea courbaril var. *courbaril* is a brazilian tree belonging to the Fabaceae family and the Caesalpinieae subfamily, popularly known as Jatobá (Ribeiro, Arizaga, Wypych, & Sierakowski, 2009). This species occurs in the Amazon Rainforest, Caatinga, Cerrado, Atlantic Forest and Pantanal (Brandão, Del Bem, Vincentz, & Buckeridge, 2009; Carvalho Filho, Arrigoni-Blank, Blank, & Rangel, 2003). It's undemanding compared to fertility and soil moisture, besides it is important for the recovery of deforested areas and afforestation of large parks and gardens (Carvalho Filho et al., 2003), and each tree produces an average of 10 kg of seeds/year that are a source of xyloglucan (Busato, Vargas-Rechia, & Reicher, 2001; Lima, Reicher, Corrêa, Ganter, & Sierakowski, 1993). This work aimed the purification and the structural and rheological characterization of the xyloglucan from the seeds of *H. courbaril* as well as evaluation of their antimicrobial and hemolytic activities, in order to direct potential biotechnological applications according to its physical-chemical profile.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The pods of *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* were collected in September 2010 at the Parque Nacional do Catimbau, Buíque-Pernambuco, Brazil. Botanical identification was made with the deposit testimonies specimens in the Herbarium of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA 84893), Brazil. Ethanol 99.8%, acetone PA, sodium chloride PA and phenol 95-98% PA were obtained from Vetec Fine Chemicals Ltda. (Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Extraction and purification of xyloglucan

The xyloglucan from the seeds was obtained by methods described by Lucyszyn et al. (2009) and Souza et al. (2010), modified as follows. The seeds were manually removed from the pods, washed and boiled in distilled water at 100 °C for 30 min for enzyme inactivation and softening of the hulls. After this period, the hull was removed and the seeds were dried at 60 °C to constant weight (m_i). The dry seeds were triturated with 0.1 M NaCl [15 % (w/v)] at 25 °C and the crude extract (CE) obtained was centrifuged (Thermo Fisher Scientific Sorvall RC6, USA) for 20 min at 1.500 x g . The supernatant was filtered through a voile tissue, followed by a new filtration using screen printing cloth (90 thread type), and precipitated with 46 % ethanol [1:3 (v/v)] for 16 h. The precipitate was filtered on screen printing cloth (110 thread type), washed with 100% ethanol [1:3 (w/v)] for 30 min and twice with acetone PA [1:3 (w/v)] for 30 min and, filtered on screen printing cloth (110 thread type) between each washing and finally dried at 60 °C until constant weight (m_f). The precipitate (purified polysaccharide) was pulverized and stored in amber glass bottles.

The yield of the extraction in mass (η_m) was determined dividing the final mass of the precipitate (m_f) by the initial mass of the dry seeds (m_i) and expressed as % w/w. The purification degree (P_x) of the xyloglucan was analyzed by the total carbohydrate dosage (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956) dividing the mass of total carbohydrate of the CE (M_f) by the

mass of total carbohydrate of the purified polysaccharide (M_i) and also expressed as % w/w.

2.3. Structural characterization

2.3.1. X-ray analysis

X-ray diffraction pattern of the xyloglucan was obtained by X-ray diffraction using a Bruker D8 Advance (Germany) diffractometer (30 kV, 30 mA) equipped with $\text{CuK}\alpha$ radiation at wavelength of 0.154 nm. The measurements were carried out for an angular interval varying from 5–60° (2 θ range), scanning rate of 5°/min, step of 0.02° and 2s per step. The total diffracted area and the area under the crystallinity peaks were evaluated by integration after correcting the data for absorption in order to determine the polysaccharide crystallinity. The relative crystallinity was taken by the ratio of the crystalline area to the total area.

2.3.2. FTIR spectroscopy

Fourier transform infrared (FT-IR) spectra of xyloglucan samples embedded in KBr were recorded on a VERTEX 70 (Bruker Optics, USA) spectrometer under dry air at room temperature (25 °C). The analysis conditions were as follows: resolution 4 cm^{-1} , co-adding 128 scans and frequency range 4000–500 cm^{-1} .

2.3.3. Monosaccharide composition

2.3.3.1. Chemical Analyses

After acid hydrolysis of the xyloglucan (5.0 M trifluoroacetic acid for 2 h at 100 °C), the alditol acetate derivatives were analyzed by gas-liquid chromatography/mass spectrometry (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japan) according to Kircher (1960).

2.3.3.2. Methylation of the Polysaccharides

The xyloglucan (5 mg) was subjected to two rounds of methylation as described by Kircher

(1960). The methylated polysaccharide was hydrolyzed with 5 M trifluoroacetic acid for 2 h at 100°C, reduced with borohydride, and the alditols were acetylated with acetic anhydride:pyridine (1:1, v/v) , by Ciucanu & Kerek (1984) and Busato, Vargas-Rechia, & Reicher (2001). The alditol acetates of the methylated sugars were dissolved in chloroform and analyzed in a gas chromatography/mass spectrometry unit.

2.3.4. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

One (1D) and two-dimensional (2D) spectra of the xyloglucan was recorded using a Bruker DRX 400 MHz apparatus with a triple resonance probe, as described previously (Busato, Vargas-Rechia, & Reicher, 2001; Tovar, Capillé, Santos, Vairo, Oliveira, Fonseca, & Mourão, 2012). Approximately 5 mg of each sample was dissolved in 0.5 ml of 99.9% deuterium oxide (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA, USA). All spectra were recorded at 50 °C with HOD (deuterated water exhibiting a peak due to exchange with residual H₂O) suppression by presaturation. For 1D ¹H NMR spectra, 32 scans were recorded, using an inter-scan delay equals 1 second (s). For 2D ¹H/¹H TOCSY (total correlated spectroscopy) and ¹H/¹³C HSQC (heteronuclear single quantum coherence) experiments, spectra were recorded using states TPPI (time proportion phase incrementation) for quadrature detection in the indirect dimension. TOCSY spectra were run with 4046 x 400 points with a spinlockfield of 10 kHz and a mixing time of 80 milliseconds (ms). Two-dimensional ¹H/¹³C Multiplicity-Edited HSQC spectra were recorded at 50 °C with HOD suppression by presaturation, with 256 scans. The increment number setup was set to 64, and states-TPPI were used for quadrature detection in the indirect dimension and run with 1024 x 256 points with globally optimized alternating phase rectangular pulses (GARP) for decoupling. Chemical shifts were displayed relative to external trimethyl-silylpropionic acid at 0 ppm for ¹H and relative to methanol for ¹³C.

2.4. ζ -potential and Dynamic Light Scattering (DLS)

Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ -potential (ζ) measurements were carried out with the xyloglucan solution 0.5% (w/v) at pH 5.8. The measurements were carried out on a ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, U.K.). The DLS cumulants analysis (30 scans) provides the characterization of a sample through the apparent *Z*-average hydrodynamic radius (*R_h*) for the particle size (nm) and polydispersity index (PDI), determined from the intensity of scattered light at 25 °C and a fixed scattering angle of 90°. Each sample was analyzed in a folded capillary cell. All measurements were carried out in triplicate with three readings for each of them. The results are given as average $\pm$ standard deviation of the nine values obtained.

2.5. Rheological measurements

The rheological properties of the xyloglucan aqueous solutions at 0.5 and 1.0% (w/v) were conducted in a stress controlled rheometer (Anton Paar MCR 301) equipped with two concentric cylinder geometry cell with outer diameter (o.d.) = 28 mm and internal diameter (i.d.) = 24 mm, with a temperature controlled at 25 °C.

2.5.1. Rotational flow studies

The continuous shear tests were carried out at 25°C over the shear rate ($\dot{\gamma}$) range of 1-1000 s⁻¹ to measure the apparent viscosity (η). Measurements were carried, and 50 points were acquired being collected the data of viscosity at the same time.

2.5.2. Oscillatory flow studies

The dynamic oscillatory mode studies were conducted varying the applied torque/deformation angular frequency, ω , from 1 to 500 rad s⁻¹. The storage (G') and loss (G'') module sample responses were recorded during the frequency sweep at a rate of one acquisition

every 5 s. The strain deformation amplitude, γ , was fixed at 0.2 % amplitude and 50 points were acquired.

2.5.3. Stress-strain studies

For the stress-strain study, the rheometer was operated in oscillatory mode. For a fixed frequency $\omega = 2\pi - \text{rad s}^{-1}$ an externally applied shear stress, τ , was varied from 1 to 300 Pa and the storage (G') and loss (G'') module sample responses were recorded. One acquisition was carried out every 5 s and 50 points were obtained.

2.6. Biological Activities

2.6.1 Antibacterial activity

Gram-negative strains [*Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Proteus vulgaris* (UFPEDA 740)] and gram-positive strains [*Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138)] were provided by Culture Collection of Microorganisms of Department of Antibiotics, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) and maintained in Nutrient Agar (NA) at 4 °C. Bacteria strains were grown in shaker flasks (250 mL) containing Nutrient Broth and incubated overnight in an orbital shaker at 100 rpm and 37 °C. The biomass concentration was determined measuring the suspension turbidity at 600 nm and then converted to colony forming units (10^5 to 10^6 CFU/mL) using appropriate calibration curves (turbidity equivalent to 0.5 in the McFarland scale). One CFU represents a viable cell capable of promoting bacterial growth. Xyloglucan antibacterial activity was investigated by the disc diffusion method according to Cole (1994). Suspensions of tested microorganisms were spread onto the surface of Mueller–Hinton agar plates. The wells of 6 mm diameter were cut from the agar and filled with 20 μL of xyloglucan solution (500 mg.mL^{-1}); also positive control wells containing neomicin (10 $\mu\text{g/well}$) and clindamicin (10

µg/well), were used. The inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h. Antibacterial activity was evaluated measuring the diameter of the growth inhibition zone around the well. All tests were carried out in triplicate.

2.6.2 Hemolytic activity for the toxicity evaluation

The hemolytic activity was determinate according Silva et al. (2013). Blood human (5 mL) was obtained from healthy volunteer. An aliquot of 4.0 mL of red blood cells was initially washed three times with saline solution (0.9% w/v NaCl), centrifugated at 1250 x *g* for 5 min and the supernatant was discarded after each wash. The red cells were diluted in solution saline to obtain a 1% suspension (v/v) and 1.1 mL was mixed with 0.4 mL of xiloglucan solution (0.25 – 2.0mg.mL⁻¹ in saline). The mixture was incubated at 37 °C in constant agitation (40 rpm) for 60 min and centrifuged at 450 x *g* for 5 min. The supernatant absorbance was measured at 540 nm. The minimum and maximum hemolytic controls were suspensions of red cells containing saline (hemolysis 0%) and Triton X-100 2.0mg.mL⁻¹ (Hemolysis 100%), respectively. All experiments were carried out in triplicate and the results expressed as average ± standard deviation. The hemolytic activity was expressed in relation to Triton X-100 and calculated by the following formula: Hemolytic activity (%) = $(A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100$, where *A_c* was the absorbance of the control, *A_s* was the absorbance in the presence of the xiloglucan solution and *A_b* was the absorbance of Triton X-100 solution.

2.7. Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using Analysis of Variance (ANOVA). Comparisons between samples were analyzed using Student's *t*-test. Statistical significance was established at *p*<0.05 (Graph Pad Prism, version 6, 2012, USA).

3. Results and Discussion

3.1.Extraction and yield

The polysaccharide extraction followed by the purification process, which minimizing its contamination by materials such as proteins and monosaccharides, is important for the yield procedure determination, whose value will enable or not the production process. Most extraction methods of xyloglucan seeds described in the literature consisting of two basic stages, where the triturated seeds pass by aqueous extraction followed by purification by alcoholic precipitation (Busato, Reicher, Domingues, & Silveira, 2009; Freitas, Busato, Mitchell, & Silveira, 2011; Kai & Petkowicz, 2010; Rosário, Noletto, Bento, Reicher, Oliveira, & Petkowicz, 2008).

The yield of the extraction in mass η_m was 71.71% and the purification degree P_x , $81.05\% \pm 7$. Previous works (Busato et al., 2009; Freitas et al., 2011) with *H. corbaril* seeds presented low yields (15.5%). The extraction with NaCl was used because increases the solubility of the contaminating free proteins (*salting in* effect), where the centrifugation removed most of the contamination of the protein crude extract, in agreement with Lucyszyn et al. (2009) results. The washing with 100% ethanol to remove possible contamination of monosaccharides and washings with acetone PA permitted the withdrawal of proteins other as seen in Busato et al., (2009) and Freitas et al. (2005) also promoted the use of a high acetone dehydration of the polysaccharide contribute to the complete drying of the sample.

Lucyszyn et al. (2009) obtained a value of 38% and Rosário et al. (2008), of 16.6%. Kai & Petkowicz (2010) compared different extraction times and observed a yield variation from 5.4 to 40.8 %. These results suggest that the high yield obtained is due to the drying seeds procedure to constant weight, just at the beginning of the extraction process, since m_i is inversely proportional to η_m . Importantly, η_p represents the actual yield of polysaccharides since they were made dosages of total carbohydrates at the beginning and at the end of the purification process. According to the data, one can conclude that the changes in the methodology were efficient to extraction the xyloglucan from *H. courbaril* seeds.

3.2.X-ray patterns

X ray diffraction profile of xyloglucan obtained from *H. courbaril* seeds (Fig.1) show characteristic of amorphous structures with no sharp peaks. X ray diffractogram presented a typical peak appearing around $2\theta = 20^\circ$ similar to those found for xyloglucan from Gokyo Food and Chemical Co. Ltd. (Mahajan, Tyagi, Patil, & Dusunge, 2013) and galactoxyloglucan extracted from Tamarind seed (Kaur, Yadav, Ahuja, & Dilbaghi, 2012).

It is known that crystalline parts give sharp narrow diffraction peaks while amorphous component gives a broad peak. The interpretation of broad amorphous peaks of several amorphous structures in X ray scattering profile is difficult and hence the ratio between these intensities is used to calculate the index of crystallinity in the material (Mishra, Kavita, & Jha, 2011). The crystallinity index displays the alignment of molecules in a particle structure (Mudgil, Barak, & Khatkar, 2012). For the xyloglucan from *H. courbaril* seeds, these index was calculated from X ray diffraction presenting an value of 0.37.

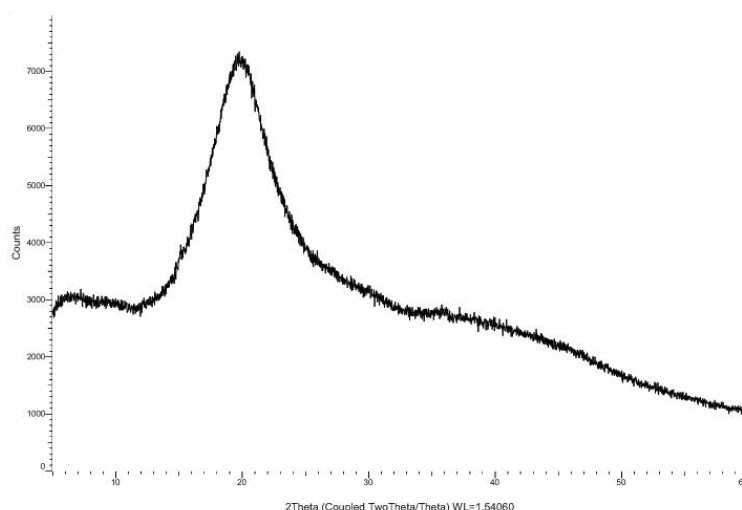


Fig. 1. X-ray pattern of the xyloglucan obtained from *H. courbaril* seeds.

3.3.FTIR spectroscopy

The characteristic absorption of xyloglucan extracted from the seeds of *H. courbaril* was qualitatively confirmed by infrared spectroscopy (Fig. 2). Its displays a characteristic broad band peak at 3420 cm^{-1} , between the region $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, representing hydroxyl (-OH) stretching

vibration from groups of glucan backbone. It normally occurs as a result of the association between the polymers being its intensity influenced by the sample concentration (Sun, Sun, Fowler, & Baird, 2005). Peaks of 2923 and 2900 cm^{-1} between the region 3000-2800 cm^{-1} can be assigned to the stretching vibration of the methylene (C-H) group (Gu & Catchmark, 2012; Kaur et al., 2012). Together, these absorption peaks are characteristic of glucose, according to Petibois et al. (1999).

The absorption band near to 1655 cm^{-1} can be attributed to the absorbed water in xylan type polysaccharides; also, the signal at 1375 cm^{-1} is due to the CH bending vibration (Ruiz et al., 2013). The peak at 1037 cm^{-1} is very near from the wave number characteristic for typical xylans at 1043 cm^{-1} , according to Sun et al. (2005), which is assigned to the CO and CC stretching vibrations of pyranose ring, common to all polysaccharides (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011).

The peak at 941 cm^{-1} may be assigned to the presence of 3,6-anhydro-galactose residue, while 895 cm^{-1} corresponds to the C1 group frequency or ring frequency, may be attributed to the β -glycosidic linkages (1 $\rightarrow$ 4) between xylose units in hemicelluloses (Sun et al., 2005).

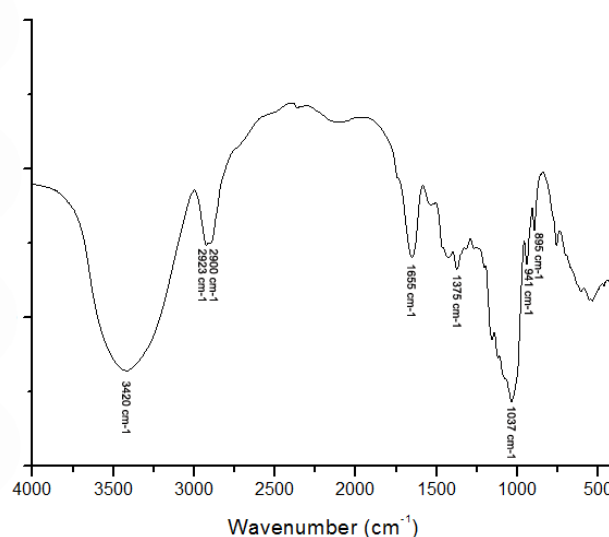


Fig. 2. FTIR spectra of the xyloglucan extracted from *H. courbaril* seeds.

3.4. Monosaccharide Composition

3.4.1. Chemical Analyses

The monosaccharide composition of the xyloglucan extracted from *H. courbaril* seeds

obtained by gas-liquid chromatography/mass spectrometry is shown in Table 1. The resulting alditol-acetates derivatives display a typical profile of the xyloglucans isolated from *H. courbaril* seeds with a molar ratio (%) for glucose, xylose and galactose (Glc:Xyl:Gal) of ~4:3:2 respectively, confirming that the glucose appears as the major component, followed by the others. Minor amount of co-purified arabinose was also detected (~6%) and no other sugars were detected on this polysaccharide up to a limit of <2% as % of dry weight.

Table 1. Comparison of the monosaccharide composition of the xyloglucan from *H. courbaril* seeds by GCMS of derived alditol acetates.

Monosaccharide composition (%)				Reference
Glucose	Xylose	Galactose	Arabinose	
40.0	34.0	20.0	6.0	This work
52.2	34.8	13.0	-	Freitas et al., 2011
54.1 - 44.4	37.2 - 32.1	15.2 - 12.3	6.3 - 1.4	Kai & Petkowicz, 2010
52.2	34.8	13.0	-	Busato et al., 2009
40.0	30.0	10.0	-	Lucyszyn et al., 2009
52.7	32.4	14.0	-	Rosário et al., 2008
50.0	40.0	10.0	-	Tiné, Silva, Lima, Carpita, & Buckeridge, 2006
49.0 - 39.0	42.0 - 32.0	16.8 - 14.0	4.8 - 1.2	Freitas et al., 2005

Hoffman et al. (2005) evaluated the branching pattern of xyloglucan from different plant species and related that some xyloglucans have an additional arabinose residue linked to the galactose residues at the end of side chain. Kai & Petkowicz (2010) suggest that the presence of arabinose is due to the arabinan co-purified, which corroborates our result. They also confirmed the absence of arabinose residues in shorter extraction processes, while Busato et al., (2001) and Freitas et al., (2005) described arabinose traces in xyloglucans from seeds.

3.4.2. Methylation of the Polysaccharides

The substitution of hydroxyl free radical by methyl is accomplished in methylation analysis,

where different O-methyl derivatives are obtained after hydrolysis and acetylation. The methylation of this polysaccharide, followed by acid hydrolysis and acetylation of the alditols, yields the derivatives showed in (Fig.3) and (Table 2). Clearly we observed a preponderance of the 2,3,6-tri-O-methyl and 2,3-di-O-methyl derivative from glucose, indicating that the preponderant structure is composed of 4-linked (unit II in the panel of proposed structure) and 4,6-substituted units (unit I). The presence of these two derivatives was also observed in a very similar proportion in the xyloglucan from *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard (Lucyszyn et al., 2011) and in the xyloglucan from *H. courbaril* seeds (Lima et al., 1993), confirming the glucose residues typical of xyloglucan cellulosic backbones.

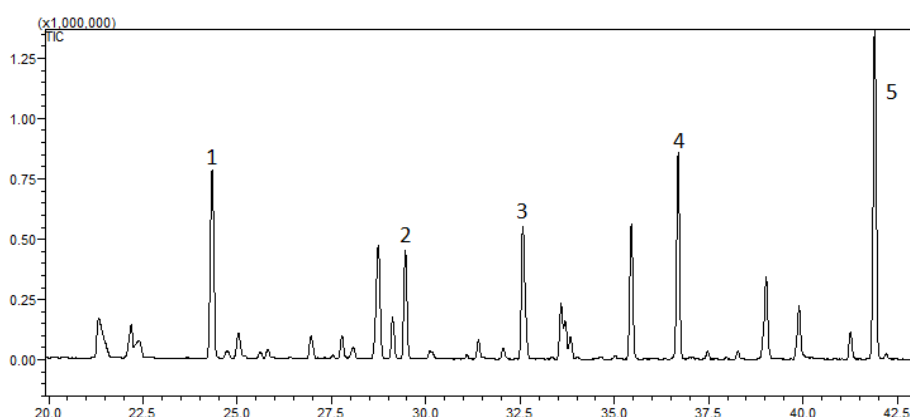


Fig. 3. Gas chromatography of the methylated derivatives obtained from the xyloglucan from *H. courbaril* seeds.

Galactose occurs as 2,3,4,6-tetra-O-methyl derivative, indicating that this sugar is a non-reducing terminal (unit IV). Two third of the xylose units occur as 2,3,4-tri-O-methyl derivative, indicating non-reducing terminal branches (unit V), as galactose. One third of xylose residues occur as 3,4-di-O-methyl derivatives, meaning that the structure presents 2-linked xylosil units (unit III). The detection of 2,3-di-O-methyl glucose in approximately the same proportion as the sum of tetra-methyl derivative from galactose + tri-methyl derivatives from xylose, agrees with the proposed structure of polysaccharide contain a central core of 4-linked glucose units (unit II), partially branched at position 6 (unit I). Two third of the xylose units (unit V) and the totality of the

galactose units (unit IV) occur as non-reducing terminal. One third of the xylose units (unit III) are 2-linked intermediate residues on the branches.

Table 2. Retention time and the proportion of the methylated derivatives obtained from the xyloglucan from *H. courbaril* seeds.

Peek number	Retention time (t _R - min)	Relative retention time	Proportion (% of total)	Methyl derivative	Units
1	24,33	1,00	22	2,3,4-tri-Me-Xyl	V
2	29,46	1,21	11	3,4-di-Me-Xyl	III
3	32,57	1,33	15	2,3,4,6-tetra-Me-Gal	IV
4	36,69	1,50	19	2,3,6-tri-Me-Glc	II
5	41,90	1,72	33	2,3-di-Me-Glc	I

The overall recoveries of methylated alditol acetates were in good agreement with the sugar values obtained for the native polysaccharide after hydrolysis, reduction and acetylation.

3.5. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The structure of the xyloglucan from *H. courbaril*, was investigated using one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) NMR spectra. The ¹H-NMR (1D) spectrum (Fig. 4A) showed three signals in the anomeric region: one at 5.17 ppm, ascribed to substituted α -xylose units (Xyl') (unit III), another at 4.98 ppm to terminal non-reducing α -xylose (Xyl) (unit V), and finally the signal at 4.58 ppm, which is overlapped of β -glucose + β -galactose anomeric protons (units I, II + IV).

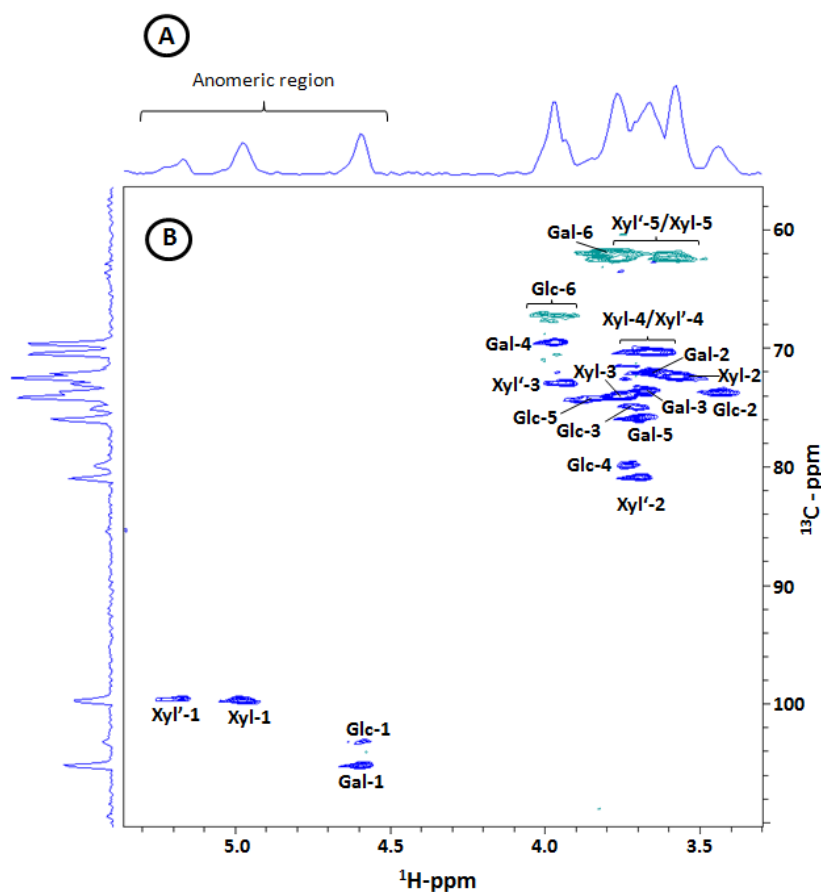


Fig. 4. One-dimensional (1D) ^1H -NMR spectra of the xyloglucan from *H. courbaril* seeds. In the spectrum ^{13}C - ^1H HSQC shown the signals of CH carbon/proton are in blue (phase signals) and those from CH_2 in green (antiphase).

The ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^1H TOCSY spectra (Fig. 5) allowed us to identify the chemical shifts by scalar coupling of the spin systems. The COSY spectrum (Fig. 5A) confirmed the overlapping of the anomeric signals from β -galactose and β -glucose units at 4.58 ppm. The TOCSY spectrum (Fig. 5B) allowed us to identify the four spin systems and to determine their proton chemical shifts (Table 3). However some signals from β -glucose and β -galactose are coincident. Furthermore the chemical shifts of H2 and H3 from β -galactose units are very close as well as the chemical shifts of H3 and H4 from β -glucose.

The edited ^{13}C - ^1H HSQC spectrum (Fig. 4B) allowed us to distinguish the anomeric signals from β -galactose (105.13 and 4.59 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ppm) (unit IV) and β -glucose (103.02 and 4.58 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ppm) (units I and II), which were coincident in the proton spectra. Signals from CH occur in phase (positive peaks in blue) while those from CH_2 occur as anti-phase (negative peaks in green). This

spectrum allowed us to identify signals from C6/H6 (67.30/3.90-4.04 ppm), ascribed to β -glucose and β -galactose units, and those from C5/H5 (62.4/3.58-3.76 ppm) of α -xylose. Signals from C4 (79.75 ppm) and some of C6 (67.30 ppm) from β -glucose, as well as signals from C2 of some α -xylose units (80.81 ppm, Xyl'), were shifted downfield compared with non-glycosylated units (compared chemical shifts from units III vs V, in Table 3 and also literature data in York, & Hawkins, 2000).

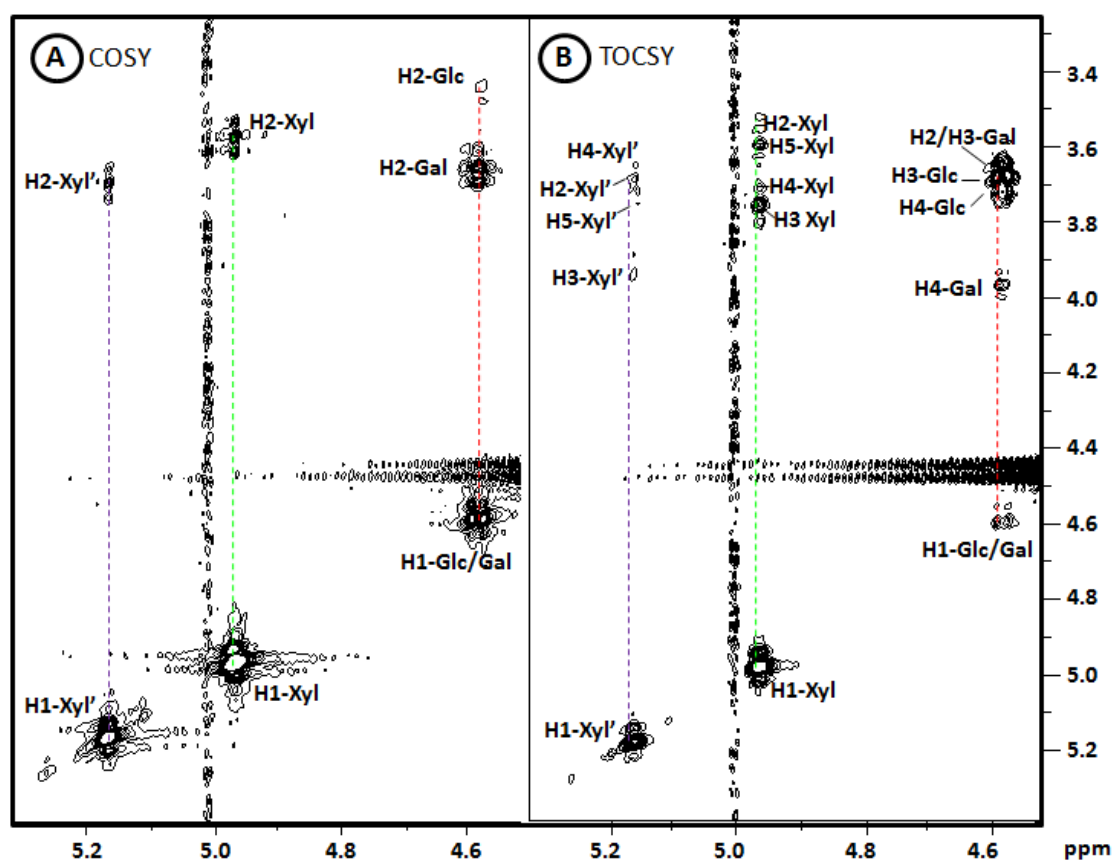


Fig. 5. Two-dimensional (2D) ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^1H TOCSY spectra of the xyloglucan from *H. courbaril* seeds. where Xyl' and Xyl represents xylose-substituted and xylose-unsubstituted, respectively.

Cell wall xyloglucans are classified as XXXG-type or XXGG-type based on the number of residues which are branched in the glucose backbone; the profile of viscosity and solubility in water varies with these branches (Nishinari, Takemasa, Zhang, & Takahashi, 2007). This backbone (1 $\rightarrow$ 4)-linked β -D-glucan is common to all xyloglucans, but differences in substitution glucose

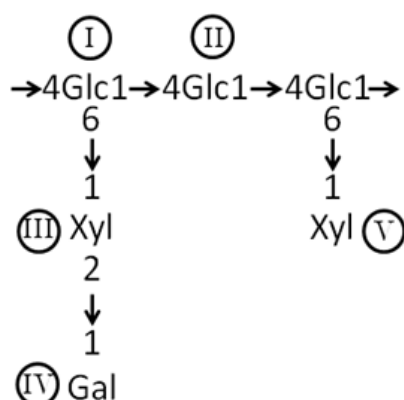
pattern, such as arrangements in number, position and type of residues, depend on the biological origin (Freitas et al., 2005) and the extraction method (Kai & Petkowicz, 2010).

In conclusion, the ^1H and ^{13}C chemical shifts shown in Table 3 were similar to those reported for a plant polysaccharide composed of a central backbone, containing 4-linked β -glucose units (unit II), partially branched at position 6 (unit I) (York, & Hawkins, 2000). The polysaccharide also is highly branched, containing α -xylose and β -galactose as non-reducing terminal units (unit IV and V respectively). Furthermore, residues of 2-linked α -xylose are also found as intermediated residues in the branches (unit III).

Table 3. ^1H and ^{13}C Proton chemical shifts of the xyloglucan from *H. courbaril* seeds.

Structure/ Chemical Units shifts		C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
b-D-Glcp	I/II	103.02/4.58	73.65/3.43	74.93/3.70	79.75/3.73	74.14/3.84	67.30/3.90-4.04
b-D-Galp	IV	105.13/4.59	72/3.66	73.5/3.68	69.4/3.96	75.8/3.7	61.84/3.79-3.88
a-D-Xylp	III	99.69/4.97	72.3/3.57	73.93/3.75	70.2/3.65	62.4/3.58-3.76	
a-D-Xylp'	V	99.5/5.17	80.81/3.7	72.8/3.96	70.2/3.65	62.4/3.58-3.76	

The structure proposed for the polysaccharide was based on our experimental data (methylation and NMR analysis) and also on literature information (Busato et al., 2001; York, & Hawkins, 2000; Lucyszyn et al., 2009), as summarized below:



3.6. ζ -potential and Dynamic Light Scattering (DLS)

Knowledge of properties of polysaccharide solutions such as zeta potential and mean hydrodynamic radius (Z -average) is crucial to obtain stable, functional nanostructures (Carneiro-da-Cunha, Cerqueira, Souza, Teixeira, & Vicente, 2011). PDI, obtained by dynamic light scattering, is a measure of the size distribution width. When polydispersity equals zero, the sample is monodisperse, PDI values close to or above 0.5 represent heterogeneous solutions in relation to the particle size and these results are characteristic of samples outside the standards, and as it increases so does the width of the distribution (Atkins & De Paula, 2010). To xyloglucan solution 0.5% (w/v) at pH 5.8, particle size and PDI value are $295,98 \pm 12,40$ nm and $0,319 \pm 0,02$, respectively, being a monodisperse solution.

Polysaccharides may be constituted either by polycations or polyanions, depending on their functional group type and can be neutral. ζ -potential was determinate in order to know charges of polysaccharide once the load is an important parameter for compounds employed in the food and health. The charge of the polysaccharide has a direct relationship with the zeta potential of the solution. Xyloglucan solution showed a ζ -potential value of $-11.3 \pm 0,27$ mV, proving to be neutral.

Another parameter that use the ζ -potential values are related to the stability of solutions. As a general rule, suspensions with zeta potential above 60 mV show an excellent stability, between 60 and 30mV are physically stable, from 30 to 5 mV are in the limit of stability and below 5mV are weak and strong likelihood to form aggregates (Müller, 1996). According to this, taking account absolute values, the xiloglucan solution are stable.

Neutral structures of xyloglucan favour the aggregation of polysaccharide chains even in very dilute solution (Picout, Ross-Murphy, Errington, & Harding 2003). According Carneiro-da-Cunha et al. (2011), the polysaccharide concentration is the most influent factor on Z-average and ζ -potential values. Anionic xyloglucan obtained from Gokyo Food and Chemical Co. Ltd (Fukusima, Japan) showing ζ -potential values of $- 21.7 \pm 1.67$ were reported by Mahajan et al.

(2013). These authors worked with xyloglucan solutions more concentrated (1.0 % w/v) and with minor pH values (4.5) than what was evaluated in this work, which could explain its anionic behavior. Similar particle sizes for xyloglucan solutions were reported in literature as the works of Freitas et al. (2011) and Kai & Petkowicz (2010), whom obtained xyloglucan extract from *H. courbaril* seeds with particle size of the 170 nm and 80 nm, respectively, although these authors have worked with xyloglucan solutions at 1 mg/mL, minor than what was studied in this work (0.5 % w/v).

3.7. Rheological analyses

The rheological behavior of the xyloglucan extracted from the seeds of *H. courbaril* at 0.5 and 1.0 % (w/v) concentrations was investigated by rotational, non-destructive oscillatory and stress-strain studies in order to evaluate their performance and potentiality as a biotechnological product.

The rotational flow studies were performed on the xyloglucan with the apparent viscosity as a function of shear rate (Fig. 6A). For both concentrations, the system behaves as a Newtonian fluid for most part of the shear-rate interval in agreement with it was demonstrated in the literature, that the xyloglucan in solution exhibits typical Newtonian flow properties and is very stable against heat, pH and shear. Furthermore, the properties of xyloglucan in water, such as solubility, viscosity and gelling ability, are closely related to their chemical structures (Busato et al., 2009; Yamatoya & Shirakawa, 2003). This type of behavior is expected for most polymer solutions and was already observed for other polysaccharides composed essentially with glucose, xylose and galactose (Khounvilay & Sittikijyothin, 2012).

The oscillatory studies measured G' and G'' as a function of the oscillatory angular frequency (Fig. 6B) and confirmed the behavior observed for other xyloglucans (Busato et al., 2009; Pongsawatmanit, Temsiripong, Ikeda, & Nishinari, 2006), whose G' and G'' continuously increase as a function of oscillating frequency. For both concentrations, there is an observable

cross-over between G' and G'' . Initially, xyloglucan behaves as a liquid, dissipating most of the energy externally applied ($G'' > G'$). Above the cross-over, an elastic behavior sets in $G' > G''$. The ability to provide both behaviors between liquid and solid states suggest the use of the xyloglucan with 0.5 and 1.0 % concentrations as membranes/coatings widely useful in many industries as one biodegradable source that can be used to improve biotechnological processes.

Fig. 6C shows a stress-strain experiment where G' and G'' are measured as a function of the shear-stress and they increase as a function of concentration with $G'' > G'$ for the entire externally applied stress interval. Similar behavior has been observed for the oscillatory measurements (see Fig. 6B) confirming that the system is essentially a Newtonian liquid for moderate applied stresses and cannot sustain elastic linear deformations. Both 0.5 and 1.0 % concentrations behave as a viscoelastic liquid where the G'' contribution has a constant value (Newtonian behavior) for a finite stress interval whereas the G' contribution decreases as a function of stress with $G'' > G'$ for the entire stress interval.

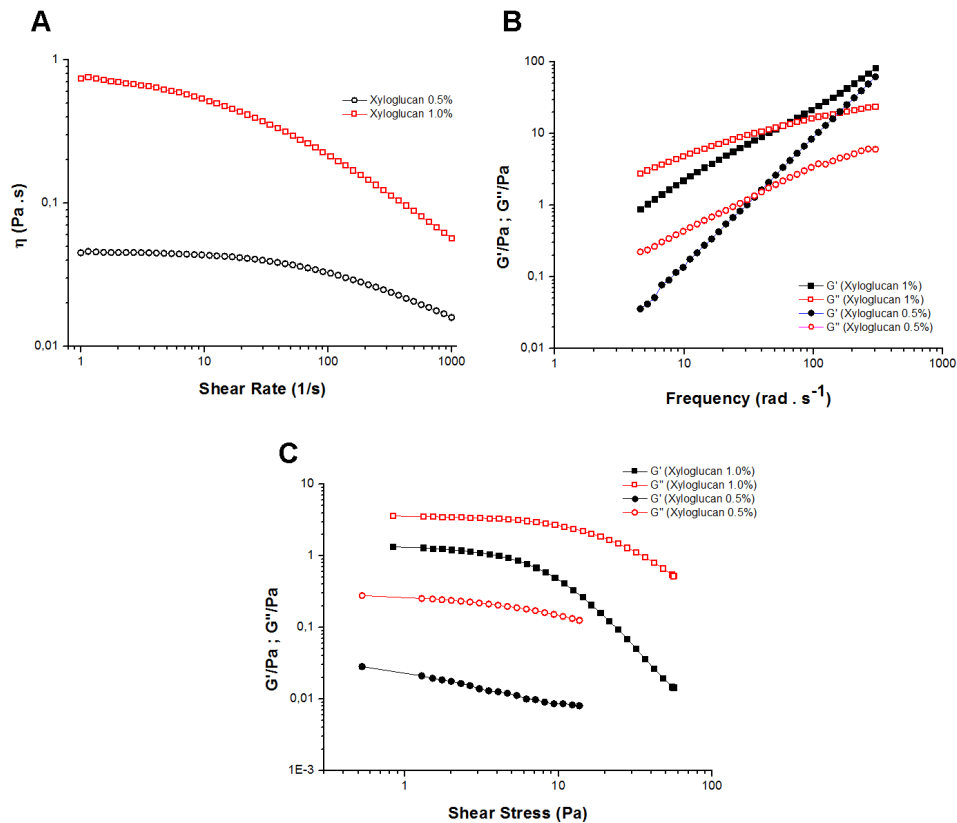


Fig. 6. Rheological analysis of the solutions obtained from the xyloglucan of the *H. courbaril* seeds at 0.5 (ball symbols) and 1.0% (square symbols) [w/v]. (A) rotational flow studies of apparent viscosity as a function of shear-rate, (B) oscillatory studies measuring G' (filled symbols) and G'' (open symbols) as a function of frequency and (C) stress-strain experiment measuring G' and G'' as a function of shear stress.

3.8. Biological Activities by antibacterial and hemolytic activity

The antibacterial activity analysis for xyloglucans has no records in the literature. For the xyloglucan from *H. courbaril* seeds extracted with our methodology, there was no zone of bacterial growth inhibition, probably due to two factors: the monosaccharide composition and the size of the polysaccharide. The xyloglucan monomers could serve as single carbon source for microbial growth, differently for the observed from chitosan (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010), that exhibits high activity, and the size of the polymer could prevent the interaction with the membrane not overcome the cell wall (Torcato et al., 2013).

The hemolytic activity of the xyloglucan was performed to rule out the possible mechanism of toxicity and to check the safety of the polysaccharide, thus making it suitable for pharmaceutical preparations. Hemolytic tests are performed because the compounds are considered toxic when their hemolysis contents are equal or more than 50%, the called HC_{50} (Ahn et al., 2013; Torcato et al., 2013). It is important to verify these contents, once their compounds having biological effects such as hemolytic activity, may not be useful in pharmacological preparations (Kalaivani, Rajasekaran, Suthindhiran, & Mathew, 2011).

The results show that control solutions Triton X-100 with 0,25-2,00mg/mL concentrations presented a percentage of hemolysis $50,7 \pm 0,04$ - $100 \pm 0,00\%$, based on the highest hemolytic effect observed. Significant hemolysis was not detected at these concentrations of xyloglucan from *H. courbaril* seeds, with hemolysis percentage of $5,4 \pm 0,32$ - $6,1 \pm 0,08\%$ showing potent application to health without apparent toxicity.

4. Conclusions

The polysaccharide extracted from *H. courbaril* var *courbaril* seeds was successfully isolated and the high mass yield was influenced by the extraction conditions used. The characterization performed by X-ray diffraction, FTIR, Monosaccharide composition and NMR confirmed that the polysaccharide has a well-defined structure of a glucose backbone with terminal units of xylose and galactose. Its structure is similar to other seed xyloglucans derived from the literature. The results of biological activities and rheological characteristics suggest the wide applicability of the xyloglucan as a biotechnological agent. Furthermore, the xyloglucan has excellent potential for industrial use as nontoxic pharmaceutical excipient, for example as a low cost thickener or an alternative to commercial polysaccharides.

5. Acknowledgments

The authors Isabel R.S. Arruda, Priscilla B.S. de Albuquerque and Alexandre G. Silva are recipient of a scholarship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Gustavo R.C. Santos is recipient of a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (MTSC, PASM, MGCC). The authors acknowledge Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) by analytical support and CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by financial support.

References

- Ahn, M., Murugan, R. N., Jacob, B., Hyun, J. K., Cheong, C., Hwang, E., Park H. -N., Seo, J. -H., Srinivasrao, G., Lee, K. S., Shin, S. Y., & Bang, J. K. (2013). Discovery of novel histidine-derived lipo-amino acids: Applied in the synthesis of ultra-short antimicrobial

peptidomimetics having potent antimicrobial activity, salt resistance and protease stability. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 68, 10-18.

Atkins, P., & De Paula, J. (2010). *Atkins' Physical Chemistry*. (9th ed.). W. H. New York: Freeman and Company.

Brandão, A. D., Del Bem, L. E. V., Vincentz, M., & Buckeridge, M. S. (2009). Expression pattern of four storage xyloglucan mobilizationrelated genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4), 1191–1206.

Busato, A. P., Reicher, F., Domingues, R., & Silveira, J. L. M. (2009). Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. *Materials Science and Engineering C*, 29, 410–414.

Busato, A. P., Vargas-Rechia, C. G., & Reicher, F. (2001). Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*, 58, 525–531.

Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente A. A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85, 522–528.

Carvalho Filho, J. L. S., Arrigoni-Blank, M. F. A., Blank, A. .F., & Rangel, M. S. A. (2003). Seedling production of *Hymenaea courbaril* L. in different environments, recipients and substrate compositions. *Cerne*, 9 (1), 109-118.

- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.
- Cole, M. D. (1994). Key Antifungal, Antibacterial and Anti-insect Assays-a Critical Review. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22 (8), 837-858.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119, 5–24.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356.
- Freitas, R. A., Martin, S., Santos, G. L., Valenga, F., Buckeridged, M. S., Reicher, F., & Sierakowski, M.-R. (2005). Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. *Carbohydrate Polymers*, 60, 507–514.
- Freitas, R. A., Busato, A. P., Mitchell, D. A., & Silveira, J. L. M. (2011). Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1636–1642.
- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P., (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25, 1514-1520.
- Gu, J., & Catchmark, J. M. (2012). Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial

cellulose assembly. *Carbohydrate Polymers*, 88, 547– 557.

Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 139-168.

Heux, L., Dinand, E., & Vignon, M. R. (1999). Structural aspects in ultrathin cellulose microfibrils followed by ^{13}C CP-MAS NMR. *Carbohydrate Polymers*, 40, 115–124.

Hoffman, M., Jia, Z., Penã, M. J., Cash, M., Harper, A., Blackburn, A. R., Darvill, A. D., & York, W. S. (2005). Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass *Asteridae*. *Carbohydrate Research*, 340, 1826–1840.

Ikeda, S., Nitta, Y., Kima, B. S., Tamsiripong, T., Pongsawatmanit, R., & Nishinaria, K. (2004). Single-phase mixed gels of xyloglucan and gellan. *Food Hydrocolloids*, 18, 669–675.

Jó, T. A., Petri, D. F. S., Beltramini, L. M., Lucyszyn, N., & Sierakowski, M. R. (2010). Xyloglucan nano-aggregates: Physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug. *Carbohydrate Polymers*, 82, 355–362.

Kai, K. C., & Petkowicz, C. L. O, (2010). Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 223–228.

Kalaivani, T., Rajasekaran, C., Suthindhiran, K., & Mathew, L. (2011). Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. indica (Benth.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,

2011, 1-8.

Kaur, H., Yadav, S., Ahuja, M., & Dilbaghi, N. (2012). Synthesis, characterization and evaluation of thiolated tamarind seed polysaccharide as a mucoadhesive polymer. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1543– 1549.

Khounvilay, K., & Sittikijyothin, W. (2012). Rheological behaviour of tamarind seed gum in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 26, 334-338.

Kircher, H. W. (1960). Gas-Liquid Partition Chromatography of Methylated Sugars. *Analytical Chemistry*, 32 (9), 1103-1106.

Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51–63.

Lima, N. N., Reicher, F., Corrêa, J. B. C., Ganter, J. L. M. S., & Sierakowski, M. R. (1993). Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (jatobá). *Carbohydr.* 45(1): 22-26.

Lucyszyn, N., Lubambo, A. F., Matos, K. F., Marvilla, I., Souza, C. F., & Sierakowski, M.-R. (2009). Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds. *Materials Science and Engineering C*, 29, 552–558.

Lucyszyn, N., Lubambo, A. F., Ono, L., Jó, T. A., Souza, C. F., & Sierakowski, M. R. (2011). Chemical, physico-chemical and cytotoxicity characterisation of xyloglucan from

Guibourtia hymenifolia (Moric.) J. Leonard seeds. *Food Hydrocolloids*, 25, 1242-1250.

MacCallum, J. L., & Tieleman, D. P. (2011). Hydrophobicity scales: a thermodynamic looking glass into lipid–protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, 36 (12), 653-662.

Maeda, T., Yamashita, H., & Morita, N. (2007). Application of xyloglucan to improve the gluten membrane on breadmaking. *Carbohydrate Polymers*, 68 658–664.

Mahajan, H. S., Tyagi, V. K., Patil, R. R., & Dusunge, S. B. (2013). Thiolated xyloglucan: Synthesis, characterization and evaluation as mucoadhesive in situ gelling agent. *Carbohydrate Polymers*, 91, 618– 625.

Mishra, A., Kavita, K., & Jha, B. (2011). Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*. *Carbohydrate Polymers*, 83, 852–857.

Mkedder, I., Travelet, C., Durand-Terrasson, A., Halila, S., Dubreuil, F., & Borsali, R. (2013). Preparation and enzymatic hydrolysis of nanoparticles made from single xyloglucan polysaccharide chain. *Carbohydrate Polymers*, 94 (2013) 934– 939

Mudgil, D., Barak, S., & Khatkar, B. S. (2012). Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum. *Carbohydrate Polymers*, 90, 224– 228.

Müller, R. H. (1996). *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. (1th ed.). Wissenschaftliche: Verlagsgesellschaft Stuttgart.

- Nishinari, K., Takemasa, M., Zhang, H., & Takahashi, R., (2007). Storage Plant Polysaccharides: Xyloglucans, Galactomannans, Glucomannans. In J. P. Kamerling, et al. (Eds), *Comprehensive Glycoscience* (pp- 614-652) EUA-Elsevier Science.
- Petibois, C., Rigalleau, V., Melin, A.-M., Perromat, A., Cazorla, G., Gin, H., & Déléris, G. (1999). Determination of Glucose in Dried Serum Samples by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Clinical Chemistry*. 45 (9) 1530–1535.
- Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B., Errington, N. & Harding, S. E. (2003). Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: tamarind seed polysaccharide and detarium gum. *Biomacromolecules*, 4, 799-807.
- Pongsawatmanit, R., Temsiripong, T., Ikeda, S., & Nishinari, K. (2006). Influence of tamarind seed xyloglucan on rheological properties and thermal stability of tapioca starch. *Journal of Food Engineering*, 77, 41–50.
- Ribeiro, C., Arizaga, G. G. C., Wypych, F., & Sierakowski, M.-R. (2009). Nanocomposites coated with xyloglucan for drug delivery: *In vitro* studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 367, 204–210.
- Rosário, M. M. T., Kangussu-Marcolino, M. M., Amaral, A. E., Noleto, G. R., & Petkowicz, C. L. O. (2011). Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. *Chemico-Biological Interactions*, 189 127–133.
- Rosário, M. M. T., Noleto, G. R., Bento, J. F., Reicher, F., Oliveira, M. B. M., & Petkowicz, C. L. O. (2008) Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. *Phytochemistry*, 69,

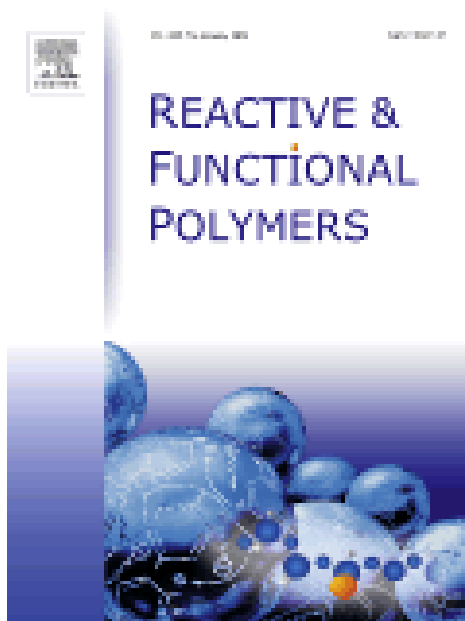
- Ruiz, H. A., Cerqueira, M. A., Silva, H. D., Rodríguez-Jasso, R. M., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Biorefinery valorization of autohydrolysis wheat straw hemicellulose to be applied in a polymer-blend film. *Carbohydrate Polymers*, 92, 2154–2162.
- Shai, Y. (2002). Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. *Biopolymers. Peptide Science*, 66, 236–248.
- Silva, J. F. V., Silva, L. C. N., Arruda, I. R. S., Silva, A. G., Macedo, A. J., Araújo, J. M., Correia, M. T. S. & Silva, M. V. (2013). Antimicrobial activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its capacity to enhance the activity of four antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (28), 2067-2072.
- Souza, M. P., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., Porto, A. L. F., Vicente, A. A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2010). Polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. tree gum (Policaju) as a coating for Tommy Atkins mangoes. *Chemical Papers*, 64 (4), 475–481.
- Suisha, F., Kawasaki, N., Miyazaki, S., Shirakawa, M., Yamatoya, K., Sasaki, M., & Attwood, D. (1998). Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C. *International Journal of Pharmaceutics*, 172, 27–32.
- Sun, X. –F., Sun, R. C., Fowler, P., & Baird M. S. (2005). Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 860-870.

- Temsiripong, T., Pongsawatmanit, R., Ikeda, S., & Nishinari, K. (2005). Influence of xyloglucan on gelatinization and retrogradation of tapioca starch. *Food Hydrocolloids*, 19, 1054–1063.
- Tiné, M. A. S. Silva, C. O., Lima, D. U., Carpita, N. C., & Buckeridge, M. S. (2006). Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Carbohydrate Polymers*, 66, 444–454.
- Torcato, I. M., Huang, Y. -H., Franquelim, H. G., Gaspar, D., Craik, D. J., Castanho, M. A. R. B., & Henriques, S. T. (2013). Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 944–955.
- Tovar, A.M.F., Capillé, N.V.M., Santos, G.R.C., Vairo, B.C., Oliveira, S-N.M.C.G., Fonseca, R.J.C., & Mourão, P.A.S. (2012). Heparin from bovine intestinal mucosa: glycans with multiple sulfation patterns and anticoagulant effects. *Thrombosis and Haemostasis*, 107, 903-915.
- Yamatoya, K., & Shirakawa, M. (2003). Xyloglucan: Structure, rheological properties, biological functions and enzymatic modification. *Current Trends in Polymer Science*, 8, 27-72.
- York, W.S., Hawkins, R., (2000). Preparation of oligomeric beta-glycosides from cellulose and hemicellulosic polysaccharides via the glycosyl transferase activity of a trichoderma reesei cellulase. *Glycobiology*, 10(2):193-201.

CAPÍTULO 2

Preparation and characterization of a bioactive xyloglucan membrane incorporated concanavalin A

Artigo a ser submetido à revista Reactive and Functional Polymers



Fator de Impacto: 2.653

Preparation and characterization of a bioactive xyloglucan membrane incorporated concanavalin A

Isabel R.S. Arruda^a, Marthyna P. Souza^a, Márcia V. Silva^a, Maria T.S. Correia^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^a, António A. Vicente^{a,b}

^aDepartamento de Bioquímica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP: 50.670-420 – Recife, PE – Brasil.

^bIBB–Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

* Corresponding author. Fax: +55-81-2126.8576; Tel.: +55-81-2126.8540

E-mail address: mgcc@ufpe.br (M. G. Carneiro-da-Cunha)

Abstract

In this work was developed xyloglucan bioactive membranes incorporated ConA with the objective to obtain a possible dressing wound. The characterization of the membranes by FTIR – ATR and microscopy of fluorescence and transmission electron demonstrated that ConA was successfully incorporated into xyloglucan membranes, retaining its native structure without loss of activity. While the gas permeability properties were not affected by ConA incorporation, the mechanical properties of the xyloglucan membrane incorporated with ConA were changed by increase of the tensile strength (TS) of 7 ± 0.26 MPa to 10 ± 0.34 MPa, and maintenance of the elongation at break (EB) of xyloglucan membranes and xyloglucan-ConA membranes with the same highly flexible nature of $30 \pm 2.68\%$ and $28 \pm 2.15\%$. Xyloglucan-ConA membranes exhibited a complete ConA release in 96 h and remained stable with 100% bioactivity at 4 °C and 30° C for 34 and 6 days, respectively, with absence of toxicity by splenocytes from BALB/c mice. Based on the results, the utilization of xyloglucan membranes incorporated with ConA reported the biotechnological potential of these materials in the conception of new topic dressings perfectly able to improve wound healing process.

1. Introduction

Biomaterials play a pivotal role in field biotechnology. Biomaterials have been employed to conduct and acceleration otherwise naturally occurring phenomena, such as tissue regeneration in wound healing [1]. Natural polymers have played an important role in this effort with emphasis on polysaccharides.

The application of polysaccharides is common on the utilization of biomaterials in order to accelerate the process of wound healing, which stimulate the immune system and contribute favorably in this process [2]. Polysaccharide membranes have been widely used in the pharmaceutical field; one of these applications is the formation of membranes with coating properties and with ability of incorporated active substances. Membranes prepared using Policaaju [3] and chitosan were developed as wound coatings, in view of their characteristics of release and adhesion [4,5].

Xyloglucan is a neutral and branched polysaccharide found in the primary cell walls of monocotyledons seeds, as well as in the cotyledon of some dicotyledonous seeds. In addition to its structural function, it also acts as energy storage. Its chemical structure has a cellulose-like backbone, composed of β -glucosyl ring units with ribbon-like conformation, where single units of xylose and galactose substituents form a part of the branches [6]. This biopolymer, like many other

polysaccharides, is potentially important for commercial and medical applications. In the food industry, it can be used as a texture modifier, and in medical applications, it can act as a drug release controller [7].

Lectins are ubiquitous proteins or glycoproteins of non-immune origin that specifically and reversibly bind to different types of carbohydrates or glycoproteins, with the ability to recognize complex carbohydrates on cell surfaces [8,9]. One of the most commonly used lectins for carbohydrate recognition is concanavalin A (ConA), which is isolated from *Canavalia ensiformis* (Jack bean). In the presence of selected metal ions, ConA has the ability to bind to D-glucose and D-mannose residues at the non-reducing terminals of polysaccharides and glycoproteins [10].

ConA presents immunomodulatory effects in several studies and has been extensively used as a mitogenic agent [11]. It can be used also as model for positive control in cellular proliferation [12,13], incorporated in polysaccharide membranes for capturing the carbohydrate antigens of the envelope glycoproteins on the virus surface [14].

The aim of this work was to preparation, structural characterization of xyloglucan bioactive membranes obtained from *H. courbaril* seeds incorporated ConA. The resulting membranes was characterized in terms of oxygen and water vapor permeability, mechanical properties, color , opacity, stability, ConA release and cytotoxicity. Such characterization this new biomaterial will help in the in developing of a possible dressing wound.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The xyloglucan was extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds were collected in September 2010 at the Parque Nacional do Catimbau, Buíque-Pernambuco, Brazil. *Canavalia ensiformis* agglutinin, [Concanavalin A (ConA)] lectin, ConA fluorescein isothiocyanate conjugate (ConA-FITC) or ConA gold conjugate (ConA-Au) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethanol 99.8%, acetone PA, sodium chloride PA and phenol 95-98% PA were obtained from Vetec Fine Chemicals Ltda. (Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Extraction of xyloglucan

The xyloglucan was extracted from *H. courbaril* seeds as the procedure reported by Lucyszyn et al. [15] and Souza et al. [16]. The dry seeds were milling with 0.1 M NaCl [15 % (w /

v)] at 25°C and the crude extract obtained was centrifuged for 20 min at 1,500 x *g* (Thermo Fisher Scientific Sorvall RC6, USA). The supernatant was filtered through a vual tissue followed by a new filtration using screen printing cloth (90 thread type) and precipitated with 46 % ethanol [1:3 (v/v)] for 16 h. The precipitate obtained was filtered on screen printing cloth (110 thread type), washed with 100% ethanol [1:3 (w/v)] for 30 min and twice with acetone PA [1:3 (w/v)] for 30 min, filtered on screen printing cloth (110 thread type) between each washing and finally dried at 60°C. The precipitate (purified polysaccharide) was pulverized and stored in amber glass bottles.

2.3. *Preparation of xyloglucan membranes incorporating ConA*

The xyloglucan filmogenic solution was prepared by dissolving 0.5 % (w/v) of xyloglucan in distilled water under agitation using a magnetic stirrer (200 rpm) for 16 h at 25°C. Subsequently, glycerol at 0.3% (v/v) as a plasticizer was added to the xyloglucan filmogenic solution and stirring (200 rpm) for two hours at 25°C. The pH was adjusted to 5.8 with 1.0 M NaOH solution. Afterwards, 15 mL the filmogenic solution was placed in acrylic plates (90 mm × 15 mm) and dried at 37 °C for 24 h. Free ConA or conjugate ConA [ConA fluorescein isothiocyanate conjugate (ConA-FITC) or ConA gold conjugate (ConA-Au)] was incorporated for dissolution of the 0.5 mg.mL⁻¹ in xyloglucan filmogenic solution. The mixing was done at 25°C for 30 min at 200 rpm. Dried membranes were stored in desiccators at 25 °C and 54% relative humidity (obtained using a Mg(NO₃)₂.6H₂O saturated solution) until testing.

2.4. *Characterization of xyloglucan membranes incorporating ConA*

2.4.1. *Infrared-attenuated total reflectance spectroscopy (FTIR)*

FTIR spectra of xyloglucan membrane and xyloglucan-ConA membrane were obtained by infrared spectrometer (VERTEX 70, Bruker Optics, USA), using Attenuated Total Reflectance (ATR) mode. The analysis conditions for scanning the spectra were 4 cm⁻¹ of resolution, co-adding 128 scans and frequency range 4000–500 cm⁻¹. All the readings were performed at room temperature (25° C).

2.4.2. *Fluorescence microscopy*

Xyloglucan membrane labeled with ConA-FITC were evaluated using a DMI 4000 B

fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The band-pass and the long-pass (488 nm) filters were used respectively to excite and to collect the fluorescence, allowing the visualization of the lectin incorporated into xyloglucan membrane in green fluorescence mode. All images were acquired with a color Pixelfly camera (PCO-TECH Inc., Romulus, MI, USA).

2.4.3. Transmission electron microscopy (TEM)

The analysis of morphology and microstructure of the xyloglucan membranes labeled with ConA-Au was observed by transmission electron microscopy (FEI Morgagni 268D 40-100kV, PHILIPS, EUA). The sample was diluted (1:5) with Milli-Q water and immobilized on copper grids dried at 30 °C for 24 hours for observation.

2.4.4. Membrane thickness

Membranes thicknesses were measured with a digital micrometer (Mitutoyo, Japan), through ten random locations around each membrane sample and expressed as average $\pm$ standard deviation. The average values were used in calculation of water vapor permeability, oxygen permeability and tensile strength.

2.4.5. Water vapor permeability (WVP)

The measurement of WVP was carried out gravimetrically as described by Carneiro-da-Cunha et al. [17]. The membrane was sealed on the top of a permeation cell containing distilled water (100% RH; 2337 Pa vapor pressure at 25 °C), placed in a desiccator at 25 °C and 0% RH (0 Pa water vapor pressure) containing silica. The cells were weighted at intervals of 2 h during 10 h. Steady-state and uniform water pressure conditions were assumed by keeping the air circulation constant outside the test cell using a miniature fan inside the desiccator. The slope of the weight loss versus time was obtained by linear regression. Three replicates were obtained for each membrane and the WVP was determined as follows:

$$(1) \quad WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P}$$

where WVTR is the water vapor transmission rate ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) through the membrane, L is the mean membrane thickness (m), ΔP is the partial water vapor pressure difference (Pa) across the two sides of the membrane. WVP expressed in $\text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$.

2.4.6. Oxygen permeability (O_2P)

Oxygen permeability (O_2P) was determined based on the ASTM D 3985-02 (2002) method described by Cerqueira et al. [18]. The membranes were sealed between two chambers having each one two channels. In the lower chamber the O_2 was supplied at a controlled flow rate to maintain its pressure constant. The other chamber was purged by a stream of nitrogen also at controlled flow. Nitrogen acted as a carrier for the O_2 . Oxygen concentration was determined by gas chromatography (Chrompack 9001, Middleburg, Netherlands) with a column Porapak Q 80/100 mesh $2\text{ m} \times 1/8'' \times 2\text{ mm}$ SS to separate the CO_2 and with a column molecular sieve 5A 80/100 mesh $1\text{ m} \times 1/8'' \times 2\text{ mm}$ to separate the O_2 followed by a thermal conductivity detector (TCD) at $110\text{ }^\circ\text{C}$. Helium at 23 mL min^{-1} was used as carrier gas. A mixture containing 10% CO_2 , 20% O_2 , and 70% N_2 was used as the standard for calibration. Three replicates were obtained for each sample and three measurements for each replicate.

2.4.7. Mechanical properties

Tensile strength (TS) and elongation-at-break (EB) were measured with an Instron Universal Testing Machine (Model 4500, Instron Corporation, USA) following the guidelines of ASTM D882-91 (ASTM D882-91, 1991) standard method. The initial grip separation was set at 30 mm and the crosshead speed was set at 5 mm min^{-1} . TS was expressed in MPa and was calculated by dividing the maximum load (N) by the initial cross-sectional area (m^2) of the specimen. EB was calculated as the ratio of the final length at the point of sample rupture to the initial length of a specimen (30 mm) and expressed as a percentage. According to the ASTM standard, membrane strips with a length of 45 mm and a width of 20 mm were used. TS and EB tests were replicated three times for each sample.

2.4.8. Color and opacity

The color of the membranes was determined with a Minolta colorimeter (CR 400; Minolta, Japan). A white color standard was used for calibration and as a background for color measurements of the membranes. L^* , a^* , b^* values of each membrane were evaluated by reflectance measurements.

The opacity (Y) of the membranes was determined according to the Hunterlab method and calculated as the ratio between the opacity of each sample on the black standard (Y_b) and the

opacity of each sample on the white standard (Yw). From three replicates of each membrane sample were determined at random three Yb and Yw and an average of them were used for calculations. The results were expressed as a percentage as $Y(\%) = \frac{Yb}{Yw} \cdot 100$ follows:

2.4.9. *Monitoring the bioactivity*

Bioactivity was evaluated by Hemagglutination assay [19], which was defined as the lowest sample dilution that showed complete hemagglutination. Samples were divided in 3 groups: ConA solution 0.5 mg.mL⁻¹ (positive control), xyloglucan membrane (XM) and xyloglucan-ConA membrane (XCM). In order to obtain XM and XCM samples were solubilized in 0.15 M NaCl until reach a final ConA concentration of 0 and 0.5 mg.mL⁻¹, respectively.

2.4.10. *ConA release from Xyloglucan-ConA membrane*

The ConA release assay was performed by incubation the Xyloglucan-ConA membrane into 15 mL of Citrate-Phosphate Buffer (0.1 M, pH 6.0) for 96 h. At predetermined times supernatant samples were collected for the determination of hemagglutinating activity (HA) and protein concentration.

2.4.11. *Stability of the membranes in storage*

The stability of the membranes during storage was determined by evaluation of hemagglutinating activity (HA) from day 0 to 97 in two groups: xyloglucan-ConA membrane (XCM) and ConA solution 0.5 mg.mL⁻¹ (positive control) at 4°C and 30°C. In determinate times, the membranes were solubilized in 15 mL 0.15 M NaCl for HA establishment.

2.4.12. *Cytotoxicity Assay*

To determine the nontoxic concentration of the samples membranes of xyloglucan and xyloglucan-ConA, splenocytes from BALB/c mice (6×10^5 cells/well) were cultured in ninety-six well plate in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 µg/mL of gentamycin. Each sample was evaluated in six concentrations (1, 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL) in triplicates. Cells were incubated in the presence of ³H-thymidine during 24 h at 37°C and 5% CO₂. Two controls were made in this experiment: negative control (cells incubated with ³H-thymidine)

and positive control (cells treated with saponin, a substance with known cytotoxic activity, and incubated with ^3H -thymidine). After 24 h, the cultures were harvested, using a cell harvester to determine the ^3H -thymidine incorporation in a beta radiation counter. The viability of the cells was determined by the ^3H -thymidine incorporation of membranes treated wells, and the cytotoxicity was calculated in relation to the ^3H -thymidine incorporation of untreated cultures according Pereira et al. [20]. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the polysaccharide concentration that reduced the number of viable cells by 50% compared with a control without polysaccharide addition.

2.5. Statistical analyses

The statistical analyses of the data were performed using Analysis of Variance (ANOVA). Comparisons between samples were analyzed using Student's t-test. Statistical significance was established at $p < 0.05$ (Graph Pad Prism, version 6, 2012, USA).

3. Results and discussion

3.1. Extraction of xyloglucan and preparation of membranes

The procedures of extraction of the xyloglucan from *H. courbaril* seeds and preparation of the polysaccharide membranes were successfully done. The xyloglucan was extracted with a yield of $71.71\% \pm 5$ calculated for yield of the extraction in mass. In order to avoid contamination with others molecules such as proteins and monosaccharides, 46 % ethanol was used for polysaccharide precipitation as reported by Souza et al. [16]. NaCl was used for increase the solubility of the contaminating free proteins and the centrifugation was realized to remove most of the protein contaminants of the crude extract, in agreement with Lucyszyn et al. [15]. Besides, it was shown that the washing with 100% ethanol and acetone were efficiently used to remove possible contaminants of monosaccharide and proteins, respectively [21,22].

The membranes utilized in this study were prepared by solvent evaporation method. The mechanism by which membranes are formed is dependent on whether the polymer is in the dissolved or dispersed state. For solutions, membrane formation occurs as the solvent evaporates, since the polymer chains are intimately mixed [23]. In a preliminary assessment we observed that xyloglucan concentrations lower than 0.5 % (w / v) produced very fragile membrane, so the choice of the concentration of the polysaccharide used in this study was 0.5%. Purified xyloglucan from tamarind seeds were utilized for the production of films with concentrations of 0.5 % polysaccharide in distilled water [24,25]. Two plasticizers glycerol and sorbitol were also subjected

to preliminary tests. Glycerol provided better flexibility to the membrane, at concentration of 0.3 % (v / v). The addition of glycerol became possible the formation of easily removable membranes from the Petri dish and the expected flexibility for future biotechnology applications, improving its handling. The adjustment of the pH to 5.8 aimed not alter the bioactivity of ConA as well as to be compatible with the pH of the human skin. The temperature and time of drying solutions were also evaluated until obtain optimal drying pattern for the formation of the membranes.

3.2. FTIR analyses

Infrared-ATR spectra of xyloglucan membrane incorporated with ConA and a xyloglucan membrane are depicted in (Fig. 1). The incorporation of lectin in polysaccharide membranes could be attributed to O-H stretching of the polysaccharide bound to the main functional groups of the lectin [26]. This can be noted in the major band at approx. 3350 cm^{-1} , corresponding to the hydrogen bonds between the ConA and xyloglucan membrane. The same observation has been reported in literature for protein incorporation into polysaccharide films [27].

The three other important bands in ConA-Xyloglucan Membrane are located at approx. 3240 cm^{-1} (Amide A), 1631 cm^{-1} (Amide I) and 1580 cm^{-1} (amide II). The ligations mainly responsible for these absorptions are the N-H 'stretch, the C=O stretch and a combination of N-H deformation and C-N stretch, respectively [26]. Between of these three bands, the most interest is the amide I absorption, since its frequency is a measure of β -pleated sheet conformations in the secondary structure of the proteins [28], proving that the ConA was entrapped with success in xyloglucan membranes, maintaining its native structure without loss of activity.

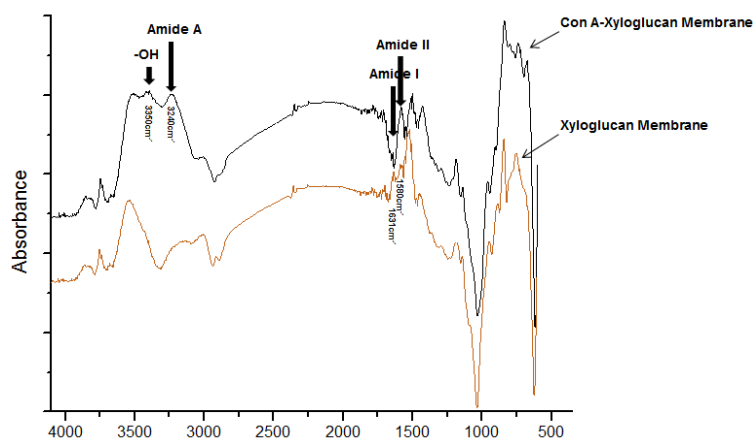


Fig. 1. Infrared-ATR spectra of xyloglucan membrane incorporated with ConA (black) and a xyloglucan membrane (red).

3.3. *Membranes morphology*

The combination of the principles of fluorescence and electron transmission microscopy allows the visualization of the membranes morphological structures, mainly the distribution of the constituents in the filmogenic matrix (Fig. 2).

Fluorescence microscopy images of xyloglucan matrix and of the xyloglucan membrane with incorporated ConA are shown in Fig. 2 (A and B). A commercially available ConA–fluorophore conjugate is often used as a label marker to localize sugar residues in biological cells using fluorescence microscopy techniques. In food microscopy, the lectin labelling technique has been used to localize bacterial exopolysaccharides in dairy yoghurt gels. The specificity of ConA may also allow localization of konjac glucomannan in a mixed biopolymer system, using CLSM techniques [10]. Xyloglucan matrix (Fig. 2A) did not show fluorescence, where as FITC-labeled lectins emitted fluorescence (Fig.2B), thus allowed visualizing protein distribution in the membrane. It is possible to observe that the ConA-FITC microstructure was homogeneously distributed throughout the xyloglucan membrane.

TEM images of the xyloglucan membranes labeled with ConA-Au was shown in Fig. 2 (C and D). It is possible to observe that the xyloglucan was able to form micro-aggregates, small spherical bodies from 1 to 2 μm . Jó et al., [29] demonstrated that the critical aggregation concentration in xyloglucan solution of Tamarindus seeds vary of 0.038 to 0.09 mg/mL, which are much lower than those used in this study (0.5 mg / mL).

This aggregation is possible due to the xyloglucan characteristic of water-solubility, but not the individual macromolecules trend to fully hydrate, and, consequently, aggregated species remain present even in very dilute solutions. The biopolymer shows the balance between hydrophobic and hydrophilic character and the Substantial chain stiffness of the cellulose-like backbone facilitates intermolecular interactions [29,30].

It is also possible to observe that ConA-Au was uniformly distributed in xyloglucan micro-aggregates. As noted by Zhang et al. [31], the presence of ConA-Au is characterized by the presence of small electron dense spheres.

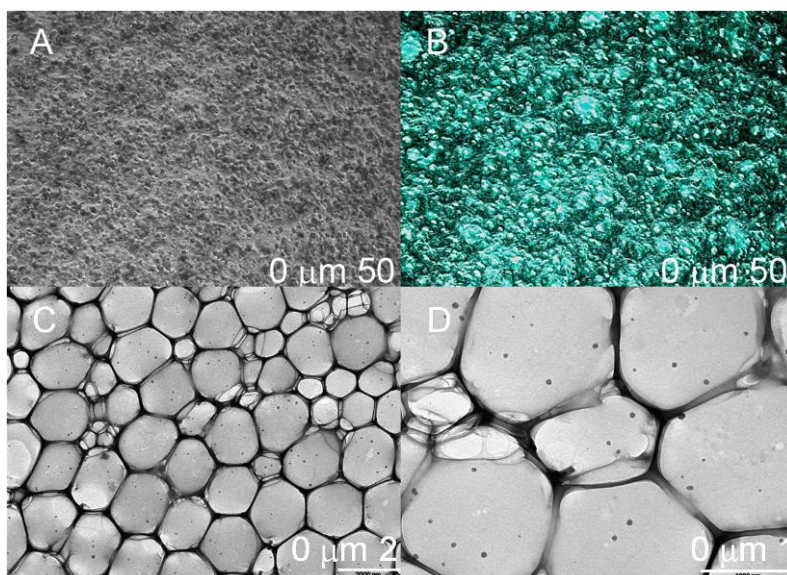


Fig. 2. Fluorescence microscopy and transmission electron microscopy images. Xyloglucan membrane (A), xyloglucan membrane with the ConA-FITC (B) and xyloglucan membrane with the ConA-Au (C, D).

3.4. Gas barrier properties

3.4.1. Water vapor permeability

The water vapor permeability is an important parameter in characterizing dressings because they can prevent excessive dehydration of the wound surface. According to Singh et al. [32], dressings which retain moist environment have many advantages over those who create a dry wound environment. Moist wound environment prevents tissue dehydration, which helps in earlier epithelialisation, accelerates angiogenesis, increases breakdown of dead tissue and fibrin contributing to autolytic debridement, potentiates interaction of growth factors with their target cells, reduces the incidence of infection and less painful in nature. Dressings that greater moisture retention is associated with fewer clinical infections, greater patient comfort and reduced scarring. The water vapor permeability of xyloglucan membranes and xyloglucan-ConA membranes were given in (Table 1), which demonstrates that the incorporation of ConA showed no significant difference between the membranes. Furthermore, the values for the thickness of the membranes are not statistical different ($p > 0.05$), possibly due to the utilization of the same xyloglucan and ConA concentratios in the experiment.

Table 1: Thickness, permeability and mechanical properties values of xyloglucan and xyloglucan-ConA membranes.

Membrane	Thicknesses (mm)	WVP 10^{-11} ($\text{g.m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$)	$\text{O}_2\text{P } 10^{-13}$ [$\text{g.m.}(\text{Pa.s.m}^2)^{-1}$]	Mechanical properties TS (MPa) EB (%)	
XM	0.039 (0.005) ^a	15.29 (0.59) ^a	6.03 (0.85) ^a	7 (0.26) ^a	30 (2.68) ^a
XCM	0.046 (0.008) ^a	16.74 (1.91) ^a	6.41 (1.40) ^a	10 (0.34) ^b	28 (2.15) ^a

Different superscript letters in the same column indicate a statistically significant difference (*t* test, $p < 0.05$).

3.4.2. Oxygen permeability

The permeabilities of xyloglucan and xyloglucan-ConA membranes were given in Table 1. The both membranes were permeable to oxygen and they could provide adequate supply of O_2 to the wound bed which will help in proper maintenance of the wound. Low oxygen concentration decreases the regeneration of tissue cell or makes possible the proliferation of anaerobic bacteria. Adequate supply of oxygen to the wound tissue is vital for optimal healing and resistance to the infection [32].

The oxygen permeability of a material depends on solubility of oxygen in the material and diffusion of the oxygen molecules in the material [25]. The incorporation of the ConA in the xyloglucan films did not affect statistically these properties. Lima et al. [33] observed similar values of oxygen permeability in galactomannan *C. pulcherrima* (0.5%) films with 1.5% collagen ($4.07 \times 10^{-15} \text{ g.m.Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$).

3.5. Mechanical properties

Membranes which are suitable for wound dressings should be strong and flexible [34]. Results showed that xyloglucan and xyloglucan-ConA membranes were highly flexible in nature and have elongation at break (EB) $30 \pm 2.68\%$ and $28 \pm 2.15\%$, respectively, and tensile strength (TS) $7 \pm 0.26 \text{ MPa}$ and $10 \pm 0.34 \text{ MPa}$. These films were found to have much higher elongation break than some reported wound dressings. Kochumalayil et al. [25] obtained 1.25 % (w/v) $78 \pm 8.6 \text{ MPa}$ of Tensile strength for xyloglucan films solubilized in water. Bergstrom et al. [24], demonstrate that xyloglucan films 0.5 % (w/v) solubilized in water have $67 \pm 4 \text{ MPa}$ of TS and $2.3 \pm 0.7\%$ of EB. Flexibility is required to over-come strains and stresses on body and only a flexible dressing could sustain various mechanical stresses with out breaking [32].

The xyloglucan-ConA membranes showed a tensile strength (TS) of 10 ± 0.34 MPa statistically greater than xyloglucan membranes 7 ± 0.26 MPa, suggesting the non formation of ConA aggregates in the membrane and a good interaction with xyloglucan. The results are in contrast with those reported from Gemili et al. [35], where the incorporation of lysozyme in cellulosic acetate films caused a significant reduction of tensile strength and elongation of break of the films before assigning it to incomplete dissolution of lysozyme solution of the polymer, which results in not distributing homogeneous lysozyme forming aggregates within the film structure.

3.6. Color and opacity

The color analyses was realized by determination of parameters L^* , a^* e b^* values, and the results are showed in Table 2. Comparing both membranes it is possible observe that has not significative difference between the membranes after the incorporation of ConA. The xyloglucan membrane with values of L^* (94.04), a^* (5.47) and b^* (4.43), have a color tending to yellow, as indicating by increasing of b^* value. These values are similar to the color values obtained for galactomanana films of 0.5%, collagen 1.5% and glycerol 0.3%, with values of $94.52 \pm 0.66 L^*$, $4.61 \pm 0.04 a^*$ and $5.84 \pm 0.03 b^*$ [33].

In relation to the opacity, the value for xyloglucan membranes is less than the xyloglucan-ConA membrane, with values of $9.45 \pm 0.99\%$ and $11.69 \pm 0.34\%$, respectively. This characteristic it is typical of the films with proteins entrapped. In agreement with Lima et al. [33], films of galactomannan 0.5% with collagen 1.5% and glycerol 0.3% shown similar opacity values of $11.34 \pm 0.01\%$.

Table 2: Colour and opacity values of xyloglucan and xyloglucan-ConA membranes.

Membrane	L^*	a^*	b^*	Opacity (%)
Xyloglucan	94.04 (0.70) ^a	5.47 (0.07) ^a	4.43 (1.62) ^a	9.45 (0.99) ^a
Xyloglucan-ConA	94.71 (0.54) ^a	5.42 (0.04) ^a	3.13 (1.11) ^a	11.69 (0.34) ^b

Different superscript letters in the same column indicate a statistically significant difference (t test, $p < 0.05$).

3.7. Monitoring the bioactivity

The importance of the evaluation of the bioactivity of ConA lectin after the incorporation into xyloglucan membrane, it is due to the specific inhibition of some lectins front of

monosaccharides. The samples of XM group do not shown hemagglutinating activity, unlike of XCM group, which maintained the hemagglutinating index (1024) compatible with the positive control, as shown in Fig. 3.

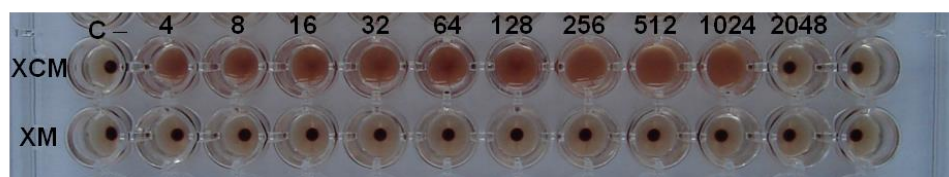


Fig. 3. Monitoring of the bioactivity.

3.8. *ConA release from membranes*

The liberation of ConA from xyloglucan membrane was carried out during 96 hours and it was represented in Fig. 4. It was observed that the measurements of protein at 8 h was 0-190 μ g representing 38% of the initial concentration of proteins entrapped into membrane. In 24 h, 48 h and 72 h, there was 242 μ g (48.4%), 389 μ g (77.8%) and 486 μ g (97.2%) of free protein respectively, representing a linear liberation. Nevertheless, the hemagglutinating activity remained stable in the end of 72 h with a hemagglutinating index (1024) compatible with the positive control. The membrane permitted a liberation of approximately 100% of ConA incorporated to exterior medium.

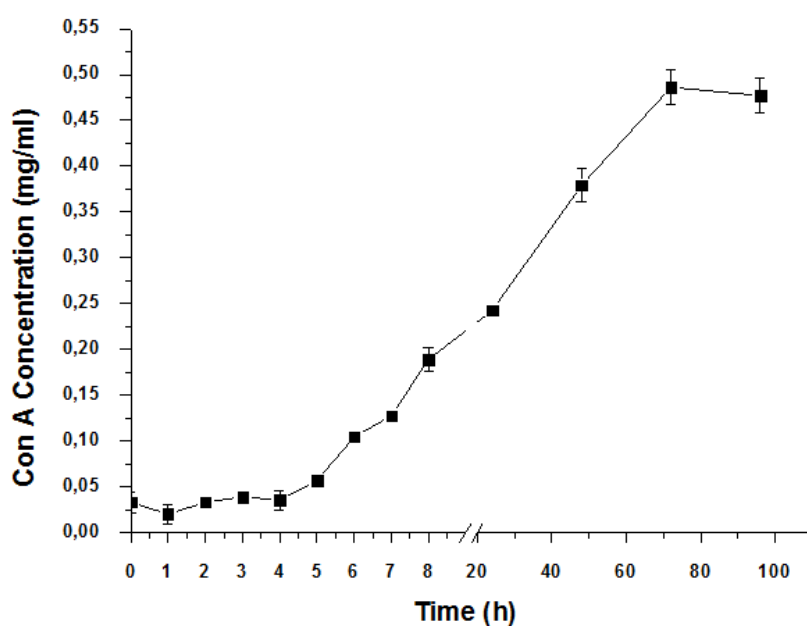


Fig. 4. Graphical representation of ConA liberation from xyloglucan-ConA membranes, protein concentration in mg/mL versus time in hour.

3.9. Stability of the membranes in storage

The stability of xyloglucan-ConA membranes XCM was evaluated over 97 days of storage on temperatures of 4 °C and 30 °C ordering a possible application as wounds dressing. In storage times of 4, 6, 10, 20, 34, 41, 48 and 97 days were collected samples for the determination of hemagglutinating activity (Fig. 5).

The membranes stored at 4 °C maintained stable for 34 days, with a reduction of the 50% in the HA at 48 days and a total loss of activity at 97 days. In 30° C the membranes maintained stable until 6 days, reducing its HA by half at 10 days and lost totally the viability at 41 days. It is noteworthy that low temperatures increasing the time of stability of the membranes. For the positive control, it was observed that at 4 °C, the membranes maintained stable for 20 days, with a reduction of 50% in the HA at 41 days and at 97 days the activity was reduced to 6%. In 30 °C the positive control maintained stable until 4 days, reducing the HA by half at 6 days and losing the viability completely at 34 days.

There was observed that the incorporation of ConA into xyloglucan membranes increasing the time of activity of the lectin. Over again, the results this study suggesting that the ConA incorporated into xyloglucan membrane showed a potential to be used to promoting the cutaneous healing.

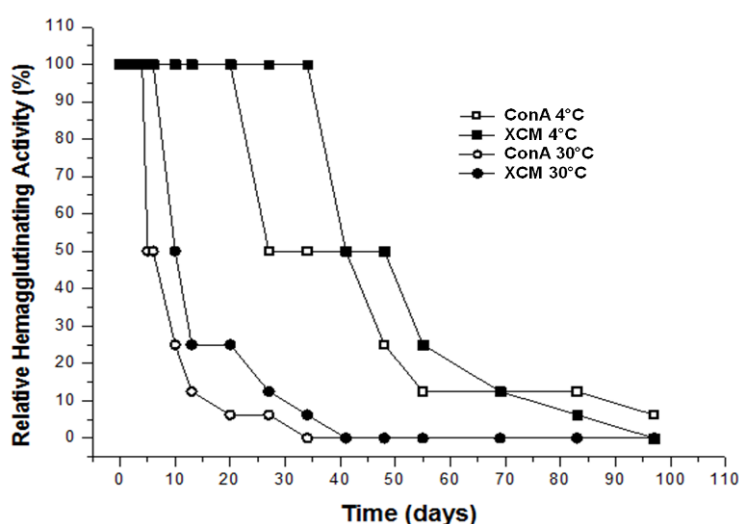


Fig.5. Stability of the xyloglucan-ConA membranes (XCM) and ConA solution (positive control) at temperatures of 4 °C and 30 °C

3.10. Cytotoxicity Assay

The study of cytotoxicity was carried out on culture of spleen cells isolated from BALB/c mice and was estimated by determining the percentage of surviving cells that were treated with membranes of xyloglucan and xyloglucan-ConA (concentrations ranging from 1 to 100 µg/mL)

compared to the non-treated control after 24 h of incubation. At the highest tested concentration (100 µg/mL), xyloglucan-ConA membranes decreased the viability of splenocytes by 12%, and no toxicity was observed up to 50 µg/mL, resulting in a CC_{50} greater than 100 µg/mL.

Lucyszyn et al. [36] obtained a value of the inhibition of the viability by 16% for a tested concentration of 3300 µg/mL of xyloglucan extracted from *Guibourtia hymenifolia* seeds and showed any detectable level of cytotoxicity on the cells at the low concentrations that were tested (up to 833 µg/mL). A study reviewed the toxicity of chitosan, a polysaccharide approved for dietary applications and use in wound dressings, showed a CC_{50} of chitosan ranges from 210 to 2500 µg/mL [37].

Through the analysis from the cytotoxicity, the high CC_{50} value obtained for membranes xyloglucan-ConA and others nontoxic concentrations indicate that this compound could be a potential biocompatible polysaccharide for biotechnological processes

4. Conclusions

Membranes based on xyloglucan were used as a matrix for the incorporation of the ConA lectin. In general, a incorporation of ConA into membranes of xyloglucan result an increasing of the tensile strength (TS) and the opacity in relation to the xyloglucan membranes itself, not showing toxicity and maintain stable with 100% of the bioactivity at 4°C for approximately 34 days. FTIR analyses suggest different chemical interactions that occur between the functional groups of ConA and active groups of the xyloglucan membrane. Due to the inherit properties that the polysaccharides has to forming a matrix for immobilization of active biomolecules, these results suggest a potential application of the xyloglucan membranes as wound dressing, which can possibly increase the healing and promote the rehabilitation of the skin lesions. New studies must be developed in order to apply these membranes *in vivo* and evaluate their efficiency.

5. Acknowledgments

The authors Isabel R.S. Arruda and Marthyna P. Souza are recipient of a scholarship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by financial support. The authors acknowledge Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) by analitical.

References

- [1] J.A. Hunbbell, Biomaterials in tissue engineering, *Nature biotechnology* 13 (1995) 565-576.
- [2] G.V. Schirato, F.M.F. Monteiro, F.O. Silva, J.L. Lima-Filho, A.M.A. Carneiro-Leão, A.L.F. Porto. O polissacaídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas, *Ciênc Rural* 36(1) (2006) 149–54.
- [3] F.M.F Monteiro, G.M.M. Silva, J.B.R. Silva, C.S. Porto, L.B. Carvalho Júnior, J.L. Lima Filho, A.M.A. Carneiro-Leão, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.L.F. Porto, Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing, *Process Biochem* 42 (2007) 884–888.
- [4] T. Dai, M. Tanaka, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev Anti Infect* 9(7) (2011) 857–879.
- [5] Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida, N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water in soluble and water-soluble conjugates, *Biomaterials* 25(2004) 907–915.
- [6] T. Hayashi, Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40 (1989) 139–168.
- [7] A.F. Lubambo, N. Lucyszyn, C.L. Petzhold, P.C. de Camargo, M.R. Sierakowski, W.H. Schreiner, C.K. Saul, Self-assembled polystyrene/xyloglucan nanospheres from spin coating evaporating mixtures, *Carbohydr Polymers* 84 (2011) 126–132.
- [8] M.C.C. Silva, L.A. Santana, R. Mentele, R.S. Ferreira, A.Miranda, R.A. Silva-Lucca, M.U. Sampaio, M.T.S. Correia, M.L.V. Olivaa, Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds, *Process Biochemistry* 47 (2012) 1049–1059.
- [9] A.F.M. Vaz, M.P. Souza, P.L. Medeiros, A.M.M.A. Melo, R.A. Silva-Lucca, L.A. Santana, M.L.V. Oliva, K.R. Perez, I.M. Cuccovia, M.T.S. Correia, Low-dose gamma irradiation of food protein increases its allergenicity in a chronic oral challenge, *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 46–52
- [10] A.R. Abhyankar, D.M. Mulvihill, V. Chaurin, M.A.E. Auty, Techniques for localisation of konjac glucomannan in model milk protein–polysaccharide mixed systems: Physicochemical and microscopic investigations, *Food Chem* 129 (2011) 1362–1368.
- [11] C.M.L. de Melo, H. Melo, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.B. da Silva, V.R.A. Pereira, Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice, *Scand J Immunol* 73(2) (2011) 112-21.
- [12] Y. Fan, W. Wang, W. Song, H. Chend, A. Tenga, A. Liu, Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*, *Carbohydr Polymers* 88 (2012) 1313– 1318.

- [13] C.M.L. Melo, M.C.A.B. Castro, A.P. Oliveira, F.O.S. Gomes, V.R.A. Pereira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Immunomodulatory Response of Cramoll 1,4 Lectin on Experimental Lymphocytes, *Phytother. Res.* 24 (2010) 1631–1636.
- [14] F. Valenga, D.F.S. Petri, N. Lucyszyn, T.A. Jó, M.R. Sierakowski, Galactomannan thin films as supports for the immobilization of Concanavalin A and/or dengue viruses, *Int J Biol Macromol* 50 (2012) 88–94.
- [15] N. Lucyszyn, A.F. Lubambo, K.F. Matos, I. Marvilla, C.F. Souza, M.-R. Sierakowski, Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds, *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 552–558.
- [16] M.P. Souza, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, J.A. Teixeira, A.L.F. Porto, A.A. Vicente, M.G. Carneiro-da-Cunha, Polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. tree gum (Policaçu) as a coating for Tommy Atkins mangoes, *Chem Pap* 64 (4) (2010) 475–481.
- [17] M.G. Carneiro-da-Cunha, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, M.P. Souza, J.A. Teixeira, A.A. Vicente. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L., *J Food Eng* 95 (2009) 379–385.
- [18] M.A. Cerqueira, A.M. Lima, J.A. Teixeira, R.A. Moreira, A.A. Vicente, Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits, *J Food Eng* 94 (2009) 372–378.
- [19] M.T.S. Correia and L.C.B.B. Coelho, Purification of a Glucose/Manose Specific Lectin, Isoforma 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu Bean), *Appl Biochem Biotechnol* 55(3) (1995) 261–273.
- [20] V.R. Pereira, V.M. Lorena, A.P. da Silva, E.M. Coutinho, E.D. Silvas, A.G. Ferreira, P. Miranda, M.A. Krieger, S. Goldenberg, M.B. Soares, R. Correa-Oliveira, Y.M. Gomes, Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice, *Parasitology* 129(5) (2004) 563–570.
- [21] R.A. Freitas, S. Martin, G.L. Santos, F. Valenga, M.S. Buckeridge, F. Reicher, M.-R. Sierakowski, Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources, *Carbohydr Polymers* 60 (2005) 507–514.
- [22] A.P. Busato, F. Reicher, R. Domingues, J.L.M. Silveira, Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*, *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 410–414.
- [23] L.A. Felton, Mechanisms of polymeric film formation, *Int J Pharm.* 457(2) (2013) 423–427.
- [24] E.M. Bergström, L. Salména, J. Kochumalayil, L. Berglund, Plasticized xyloglucan for improved toughness—Thermal and mechanical behavior, *Carbohydr Polymers* 87 (2012) 2532–2537.

- [25] J.J. Kochumalayil Q. Zhou W. Kasai, L.A. Berglund, Regioselective modification of a xyloglucan hemicellulose for high-performance biopolymer barrier films, *Carbohydr Polymers* 93 (2013) 466–472.
- [26] N. Ockman, Interaction of monolayers of concanavalin A with mono- and polysaccharides. A study by means of infrared-attenuated total reflectance spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 643(1) (1981) 220-232.
- [27] P. Kanmani, J.-W. Rhim, Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract, *Carbohydr Polymers – In Press* (2013).
- [28] J. Kong, S. Yu, Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, *Acta Bioch Bioph Sin* 39(8) (2007) 549–559.
- [29] T.A. Jó, D.F.S. Petri, L.M. Beltramini, N.Lucyszyn, M.R. Sierakowski, Xyloglucan nano-aggregates: Physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug, *Carbohydr Polymers* 82 (2010) 355–362
- [30] D.R. Picout, S.B. Ross-Murphy, N. Errington, S.E. Harding, Pressure Cell Assisted Solubilization of Xyloglucans: Tamarind Seed Polysaccharide and Detarium Gum, *Biomacromolecules* 4 (2003) 799-807.
- [31] J. Zhanga, C. Wang, S. Chen, D. Yuan, Xia Zhong, Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase–lectin biospecific interaction, *Enzyme and Microb Tech* 52 (2013) 134–140.
- [32] B. Singh, S. Sharma, A. Dhiman, Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: Biomedical properties and histological study of wound healing, *Int J Pharm* 457 (2013) 82–91.
- [33] A.M. Lima, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, E.C.M. Santos, J.A. Teixeira, R.A. Moreira, A.A. Vicente, New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – Influence on fruits gas transfer rate, *J Food Eng* 97(1) (2010) 101–109.
- [34] M.P. Devi, M. Sekar, M. Chamundeswari, A. Moorthy, G. Krithiga, N.S. Murugan, T.P. Sastry, A novel wound dressing material–fibrin–chitosan–sodiumalginate composite sheet. *Bull. Mater. Sci.* 35 (2012) 1157–1163.
- [35] S. Gemili, A. Yemenicioglu, S.A. Altinkaya, Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme, *J Food Eng* 90 (2009) 453–462.
- [36] N. Lucyszyn, A.F. Lubambo, L. Ono, T.A. Jó, C.F. Souza, M.R. Sierakowski, Chemical, physico-chemical and cytotoxicity characterisation of xyloglucan from *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard seeds, *Food Hydrocolloids* 25, (2011) 1242-1250.
- [37] T. Kean, M. Thanou, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv Drug Deliv Rev* 62 (2010) 3–11.

CAPÍTULO 3

Aplicação *in vivo* de membrana bioativa de xiloglucana com concanavalina A incorporada como curativo tópico

Artigo a ser submetido à revista Química Nova



Aplicação *in vivo* de membrana bioativa de xiloglucana com concanavalina A incorporada como curativo tópico

Isabel R.S. Arruda^a, Maria H. M. Lima-Ribeiro^b, Túlio D. Silva^a, Paloma L. Medeiros^c, Márcia V. Silva^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^a, António A. Vicente^{a,d}, Maria T.S. Correia^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, CEP: 50.670-420 – Recife, Brasil.

^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA (UFPE), Recife, Brasil.

^cDepartamento de Histologia e Embriologia (UFPE), Recife, Brasil.

^dIBB– Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

* Corresponding author. Fax: +55-81-2126.8576; Tel.: +55-81-2126.8540

E-mail address: mtscorreia@gmail.com (Maria T.S. Correia).

RESUMO

Neste trabalho foi aplicado membranas bioativas xiloglucano incorporados ConA com o objetivo de obter a capacidade de aumentar a velocidade de cicatrização, reduzir o número de células inflamatórias e melhorar a qualidade do tecido formado sobre lesões cutâneas experimentais em camundongos. O grau de esterilização do procedimento cirúrgico foi confirmado pela avaliação microbiológica. O grupo MXC apresentou sinais de clínicos de inflamação estatisticamente menos intensos em comparação com os grupos C e MX. A contração da área da lesão ocorreu de forma mais rápida e completa no grupo MXC em relação aos demais grupos analisados. As imagens macroscópicas das lesões foram análogas com os achados histopatológicos, estas apresentaram uma completa reepitelização do grupo MXC no décimo dia após a cirurgia. O uso de MXC não estimulou a modulação de citocinas em relação aos grupos controles. E a análise do proteoma do soro dos grupos tratados com os grupos C, MX e MXC, revelou 7 proteínas diferencialmente expressas. Com base nos resultados, a aplicação de membranas ativas à base de xiloglucana com ConA incorporada, foi eficaz para a reparação de lesões experimentais em camundongos em um breve período de tempo, revelando um potencial curativo na reabilitação de lesões cutâneas.

1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização da pele ocorre para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido. Para isso, o organismo faz uso de uma sequência de eventos bioquímicos e celulares em resposta a uma lesão tecidual. Estes eventos são divididos nas seguintes fases: inflamatória, proliferação ou granulação da matriz extracelular (MEC) e remodelação da MEC para formação da cicatriz¹. Os principais fatores que devem ser analisados na escolha de um curativo adequado para pele, são: controle da infecção, geração de um ambiente úmido e rico em O₂ para promoção da cicatrização, proteção da área de trauma mecânico². A transparência desses curativos permite o gerenciamento durante o tratamento da lesão através do monitoramento visual. Curativos transparentes com atividade cicatrizante possibilitam a detecção precoce de infecções no local da lesão³. A gaze de algodão são tradicionalmente utilizados como curativo que pode proteger a lesão contra trauma mecânico e infecção por microorganismos. Contudo, estes aderem à área da lesão e não permitem a sua visualização⁴. A evolução de uma lesão da pele e a eficácia de um tratamento específico pode ser acompanhado e avaliado em intervalos regulares por vários métodos, até que a descontinuidade da pele tenha sido restabelecida⁵.

O uso de biomateriais para aplicação na cicatrização cutânea tais como polissacarídeos

naturais, é preferido para curativos de pele devido a varias vantagens, tais como biocompatibilidade, a propriedade não irritante e não tóxica, e a facilidade e segurança na aplicação⁶. Membranas de polissacarídeos podem ser utilizadas no desenvolvimento de curativos para aplicação no reparo tissular^{7, 8}.

Membranas à base de xiloglucana apresentam uma estrutura que permite a incorporação de substâncias funcionais^{9, 10, 11}, tais funções como mitogênicas e antitumorais, por exemplo a ConA uma lectina presente nas sementes de *Canavalia ensiformis*^{12, 13}. Aplicações diversas utilizam ConA incorporada em membranas polissacarídicas^{14, 15}. O objetivo do presente trabalho foi a de incorporar ConA em membrana à base de xiloglucana, a fim de desenvolver um curativo tópico ativo, com a capacidade de aumentar na velocidade de cicatrização, reduzir o número de células inflamatórias e melhorar a qualidade do novo tecido formado sobre lesões cutâneas experimentas em camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Camundongos (*Mus musculus*) BALB/c machos (n = 15/grupo) 12 semanas de idade pesando em média 37,0± 1,5 g, obtidos e mantidos no biotério de cirurgia experimental do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE. Cada animal foi mantido em uma gaiola individual, sob condições ambientais controladas (12 h ciclo claro/escuro, temperatura 23 ± 1°C e umidade de 55 ± 10%) com livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados entre 9h e 16h. Os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPE), processo nº 23076.029229/2011-17.

2.2. Obtenção da membrana de xiloglucana com e sem ConA

As membranas de xiloglucana (MX) foram preparadas com a solução a 0,5% (m / v) de xiloglucana em água destilada, sob agitação (200 rpm) durante 16h a 25°C. Em seguida, foi adicionado a solução, o plastificante glicerol a 0,3% (v / v) e agitado (200 rpm) por mais duas horas a 25°C. O pH foi ajustado para 5,8 com solução 1,0 M de NaOH. Posteriormente, 15 ml da solução foi colocada em placas de acrílico (90 mm x 15 mm) e secou-se a 37°C durante 24 h. Para

preparação das membranas de xiloglucana com ConA (MXC), ConA foi incorporada na solução de xiloglucana em $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. A mistura foi realizada a 25°C durante 30 min a 200 rpm e as membranas foram secas e utilizadas com intervalo máximo de 48h.

2.3. Procedimento cirúrgico e grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos ($n = 15/\text{grupo}$) e submetidos a experimentos cirúrgicos sob anestesia intraperitoneal com 2% (p/v) de cloridrato de xilazina e 10% (p/v) de cloridrato de cetamina (10 e 115mg/kg, respectivamente). Para a confecção do acesso cirúrgico asséptico, foi realizada a tricotomia e anti-sepsia da região torácica dorsal com 1% iodopovidone e etanol 70%. Uma lesão padrão (0,8 centímetros de diâmetro) foi realizada por remoção de camadas epidérmicas e dérmicas com hemorragia mínima usando tesouras cirúrgicas. A hemostasia da área foi efetuada por compressão digital, quando necessária. A avaliação microbiológica foi realizada utilizando "swab" estéril na área da lesão para cada animal no momento da cirurgia, semeado em placa contendo Ágar Mueller-Hinton (AMH) e posteriormente incubado a 37°C por 24h, esta avaliação de rotina foi realizada para garantir o grau de esterilização do procedimento. O tratamento foi aplicado no dia da cirurgia onde cada lesão foi tratada com as membranas dos grupos (MX) e (MXC), com exceção dos grupos controles (C) que foram tratados com 100 μL de NaCl 0,15M.

2.4. Avaliação clínica, contração e análise histopatológica da lesão

As características clínicas das feridas experimentais foram observadas diariamente, considerando os seguintes aspectos: edema, hiperemia, formação de crostas e formação de tecido cicatricial. Três animais de cada grupo experimental foram submetidos à anestesia (igual à cirúrgica) após 0, 3, 6, 10 e 14 dias do procedimento cirúrgico, onde as áreas das feridas foram medidas usando um paquímetro e calculadas da seguinte forma: $A = \pi.R.r$ (A = Área da ferida ; R e r os raios da ferida maior e menor, respectivamente). O cálculo do grau de contração foi expresso em percentagem utilizando as equações de Ramsey¹⁶, $100 \times (A_i - A_f) / A_i = M \pm DP$ (A_i = Área inicial da ferida; A_f = Área da ferida no dia da biópsia; M = Média; DP = Desvio padrão). A pele em torno da área da ferida foi removida, 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 transferidas para papel de filtro e incubados em formaldeído a 4% (v / v) em PBS 0,01 M, pH 7,2 durante um período máximo de 48 horas para o processamento das secções histológicas. Os mesmos foram incluídos em parafina, e após a microtomia, corados com

hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). Ao final os animais foram sacrificados com doses letais de Pentobarbital sódico (200mg.Kg^{-1}) por via intraperitoneal.

2.5. **Análise de citocinas por citometria de fluxo**

Nos dias 0, 3, 6, 10 e 14 do procedimento cirúrgico com os animais anestesiados, foram coletadas amostras de sangue (1mL / animal), pela técnica da punção cardíaca, para a obtenção do soro, o qual foi utilizado nas dosagens de citosinas e análise da proteômica.

Kits Milliplex de imunoensaio para análise de citocinas de camundongos foram obtidos pela Genese Produtos Diagnósticos Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Placas de 96 poços MultiScreen com membrana Ultracel Millipore (Bedford, MA) foram usadas para todos os kits de citocinas Multiplex. Os ensaios foram executados em triplicado de acordo com o protocolo do fabricante. Os dados foram coletados usando o citômetro de fluxo MagPix Analyser 200 (Luminex, Austin, EUA). A análise dos dados foi realizada utilizando o software Xponente versão 4.2. Uma fórmula de regressão de quatro parâmetros foi utilizada para calcular as concentrações da amostra a partir das curvas padrão.

2.6. **Proteômica do soro**

2.6.1. *Extração e quantificação das proteínas*

Amostras congeladas de soro dos animais tratados com os três grupos C, MX e MXC foram submetidas ao método de extração com trizol, de acordo com as instruções do fabricante Trizol (Invitroge®). E as proteínas totais foram quantificadas de acordo com as instruções do Kit 2D Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), utilizando albumina de soro bovino (BSA $2,0\text{ mg mL}^{-1}$), como padrão.

2.6.2. *Eletroforese bidimensional (2-DE) e análise de imagem*

Uma alíquota de $600\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas foi homogeneizada em 250 mL de tampão de reidratação que continha 8 M de uréia, 2% w / v CHAPS, 20 mM DTT, tampão IPG 4-7 $0,5\%$ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), e $0,002\%$ azul de bromofenol e carregado as amostras em tiras IPG (13 cm com uma faixa linear de IPG pH 4-7, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) depois de uma breve sonicação e centrifugação. A focalização isoeletrica foi realizada no sistema Ettan IPGphor III

segundo o protocolo do fabricante. Antes de executar a segunda dimensão da eletroforese bidimensional, as tiras IPG foram equilibradas por 15 min primeiro em tampão fresco [6 M uréia, 30% (p/v) de glicerol, 2% (p/v) SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 8,8], com a adição de 100 mM DTT e, posteriormente, por 15 min em tampão fresco suplementado com 0,25 M iodoacetamida. As tiras IPG equilibradas foram transferidos para um gel SDS PAGE 12,5% corridas através da utilização de uma Unidade de Eletroforese Ettan Ruby SE 600 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). As proteínas em géis foram visualizadas através da coloração com Coomassie Brilliant Blue (CBBR250) segundo Candiano et al.¹⁷. Imagens dos géis foram adquiridos com uma resolução de digitalização de 300 dpi, em seguida, analisados com o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), de acordo com protocolos fornecidos pelo fabricante. A quantidade de cada local foi normalizada pela intensidade total de spots válidos. Spots de proteínas foram considerados diferencialmente expressos se a intensidade se modificou estatisticamente nos diferentes dias.

2.6.3. *Análise das proteínas por MALDI-TOF/TOF MS*

A digestão das proteínas em gel foi realizada conforme descrito por Shevchenko et al.¹⁸, com pequenas modificações. Tripsina foi utilizada em uma concentração de 25 ng/mL e os passos de redução e alquilação foram omitidos. Os peptídeos foram dissolvidos em 10 µL de TFA 0,1%. A solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, CHCA (4 mg/mL) em ACN 50% e 0,3% TFA foi misturada com igual quantidade de amostra e colocado na placa Anchor Chip 800/384 (Bruker Daltonic GmbH) e secas em fluxo de ar laminar para recristalização. Para a calibração 0,5 µL de peptídeo padrão de calibração (Bruker Daltonik GmbH) foram misturados com 0,8 µL de matriz CHCA e recristalizado também. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF (Ultraflex III, Bruker Daltonics) no modo reflectron.

2.6.4. *Análise de dados MS/MS*

A análise dos dados foi realizada utilizando a ferramenta de busca MASCOT (Matrix Sciences, UK). Pesquisas foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: a tolerância em massa foi definido para 100 ppm. Tripsina foi definida como enzima proteolítica com uma clivagem perdida permitida. Carga do peptídeo +1 foi utilizada. Carbamidometilação de resíduos de cisteína foi definida como modificação fixa e oxidação de resíduos de metionina foi definida como a modificação variável. MSDB, Swissprot e bancos de dados NCBI nr foram utilizados para

identificar proteínas de soro dos camundongos com um servidor MASCOT disponíveis on-line (Matrix Science, UK). Proteínas foram denominadas identificadas, se pelo menos dez peptídeos combinaram com os do banco de dados, com uma pontuação de íons MASCOT peptídeo maior do que 85. Os bancos de dados usados foram liberados em agosto de 2006 (MSDB), em outubro de 2007 (NCBIInr) e maio de 2009 (UniProt/Swissprot, release 15.2).

2.7. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita através de análise de variância (ANOVA), e o Teste *t* de Student, utilizando o programa (Graph Pad Prism, version 6, 2012, USA), Para detectar diferenças entre os grupos. Todos os resultados foram expressos em valores médios dos grupos $\pm$ desvio padrão e foram analisados considerando os valores de $p \leq 0,05$ significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise da cicatrização das lesões

No acompanhamento da contaminação experimental, a análise microbiológica mostrou que não houve crescimento de microorganismos nas lesões de todo o grupos estudados, confirmando o grau de esterilização do procedimento cirúrgico. A evolução dos sinais clínicos e as médias das áreas lesionadas estão relacionados na (figura 1). Os achados macroscópicos, em relação a área da lesão, foi observado uma diferença significativa em termos da contração da lesão após o sexto dia, onde o grupo MXC apresentou uma área de $0,08 \pm 0,01 \text{ cm}^2$ e os grupos C e MX ainda apresentavam áreas de $0,21 \pm 0,03 \text{ cm}^2$. No décimo dia para o grupo MXC ocorreu a completa reepitelização não havendo como medir a lesão, enquanto que para os grupos C e MX ainda apresentavam uma área de $0,03 \pm 0,01 \text{ cm}^2$.

O grupo MXC apresentaram sinais de clínicos de inflamação, tais como: edema e hiperemia estatisticamente menos intensos em comparação com os grupos C e MX. No sexto dia após a cirurgia não foi observado hiperemia para os grupos MX e MXC, enquanto que 66,7% dos animais do grupo C ainda apresentavam este sinal flogístico. Edema não foi observado no grupo MXC ao sétimo dia, entretanto 40% dos animais dos grupos C e MX permaneceram com este sinal clínico.

A crosta primaria estava presente no primeiro dia em 20% e 13% dos animais tratados com MXC e MX, respectivamente, e não foi observada no grupo C. Os primeiros sinais do tecido de cicatrização foram no sétimo dia com 60% dos animais tratados com o grupo MXC e 46% do grupo

MX, apenas 33% dos animais tratados com o grupo C apresentaram sinais do tecido de cicatrização no oitavo dia após a cirurgia.

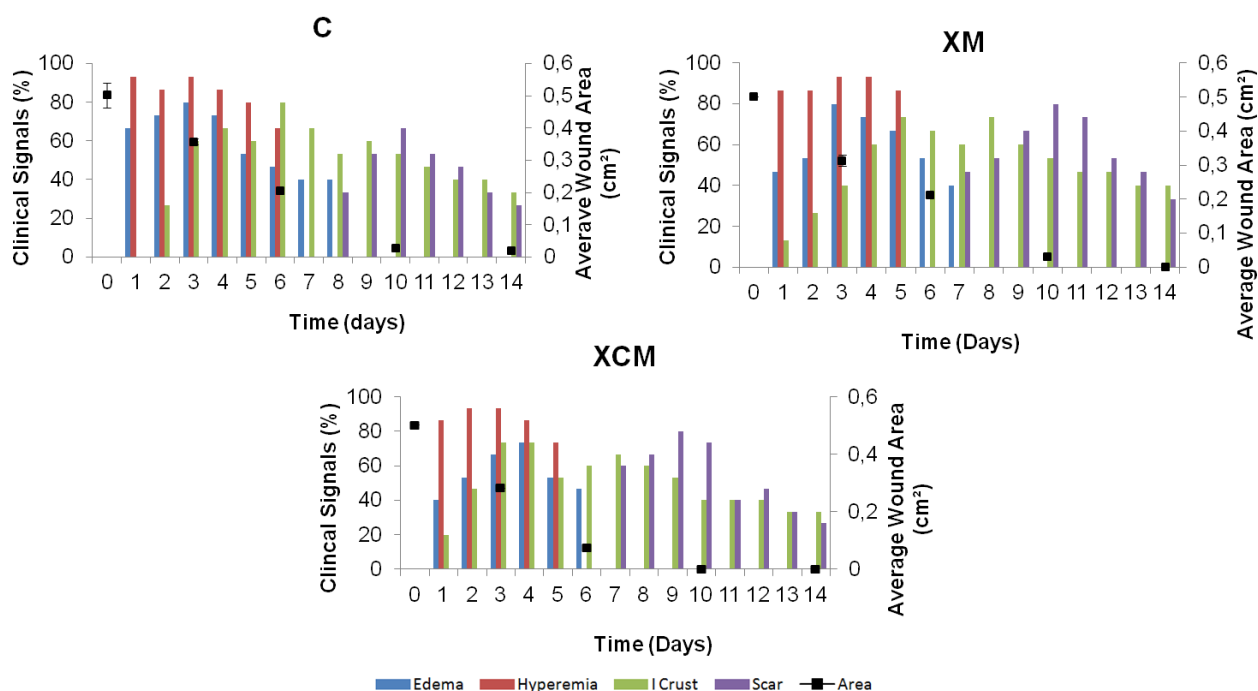


Figura 1. Variação com o tempo dos sinais clínicos e área da lesão, após o tratamento tópico com os grupos (C) NaCl 0,15M, (MX) membrana de xiloglucana e (MXC) membrana de xiloglucana com ConA.

Macroscopicamente, a cicatriz estava presente no grupo tratado com MXC no décimo dia após a cirurgia, no entanto, esta só foi possível presenciar no décimo quarto dia para os grupos tratados C e MX.

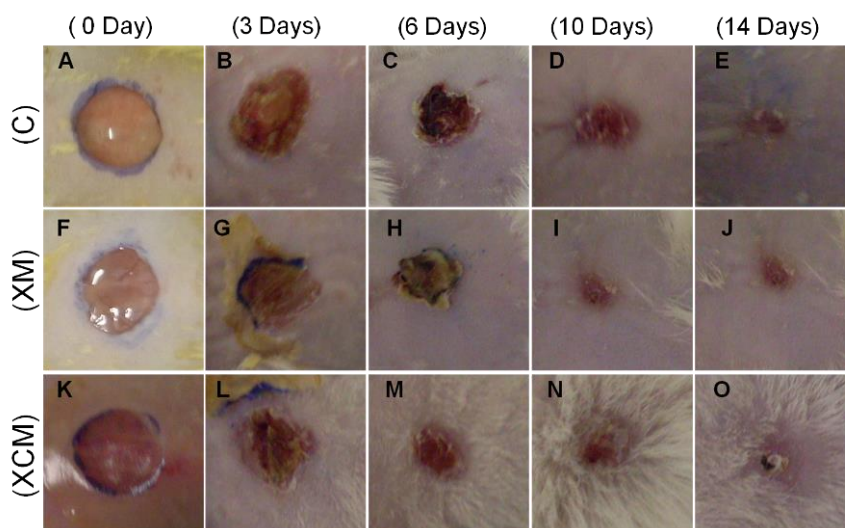


Figura 2. Evolução temporal macroscópica das áreas das lesões dos grupos tratados com (C) NaCl 0,15M, (MX) membrana de xiloglucana e (MXC) membrana de xiloglucana com ConA.

3.2 Análise histológica

A avaliação microscópica do processo de cicatrização dos grupos tratados com C, MX e MXC foi acompanhada pela presença de crosta, infiltração de células inflamatórias, angiogênese, impregnação de colágeno, formação de tecido de granulação e reepitelização da lesão, demonstrada na figura 3.

No terceiro dia após a cirurgia, no grupo C ocorre a presença de crosta, constituída de plasma e restos celulares ocupando a região mais superficial da lesão e presença de discreto infiltrado inflamatório. O grupo MX apresenta além da crosta e infiltrado inflamatório intenso, uma nítida angiogênese e para o grupo MXC além dos elementos já visualizados nos outros grupos observa-se a presença de fibroblastos. Para o sexto dia, nota-se a área de transição entre ferida e tecido normal no grupo C, observa-se a formação inicial de tecido de granulação fibrovascular e área de transição bem definida no grupo MX, já no grupo MXC ocorre a proliferação de vasos e fibroblastos, a formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. No décimo dia ocorre o amadurecimento do tecido de granulação e o início da deposição de colágeno para os grupos C e MX, entretanto para o grupo MXC inicia-se a redução da deposição de colágeno, fase de remodelamento e o processo de reepitelização da lesão. No décimo quarto dia ainda ocorre a deposição de colágeno para o grupo C, porém para os grupos MX e MXC observa-se a reorganização da matriz extra celular na região cicatricial. O grupo tratado com MXC teve a lesão completamente cicatrizada no décimo dia após a cirurgia, enquanto que a cicatrização de outros grupos C e MX ainda estava em curso. É importante salientar que as imagens macroscópicas das lesões foram análogas com os achados histopatológicos.

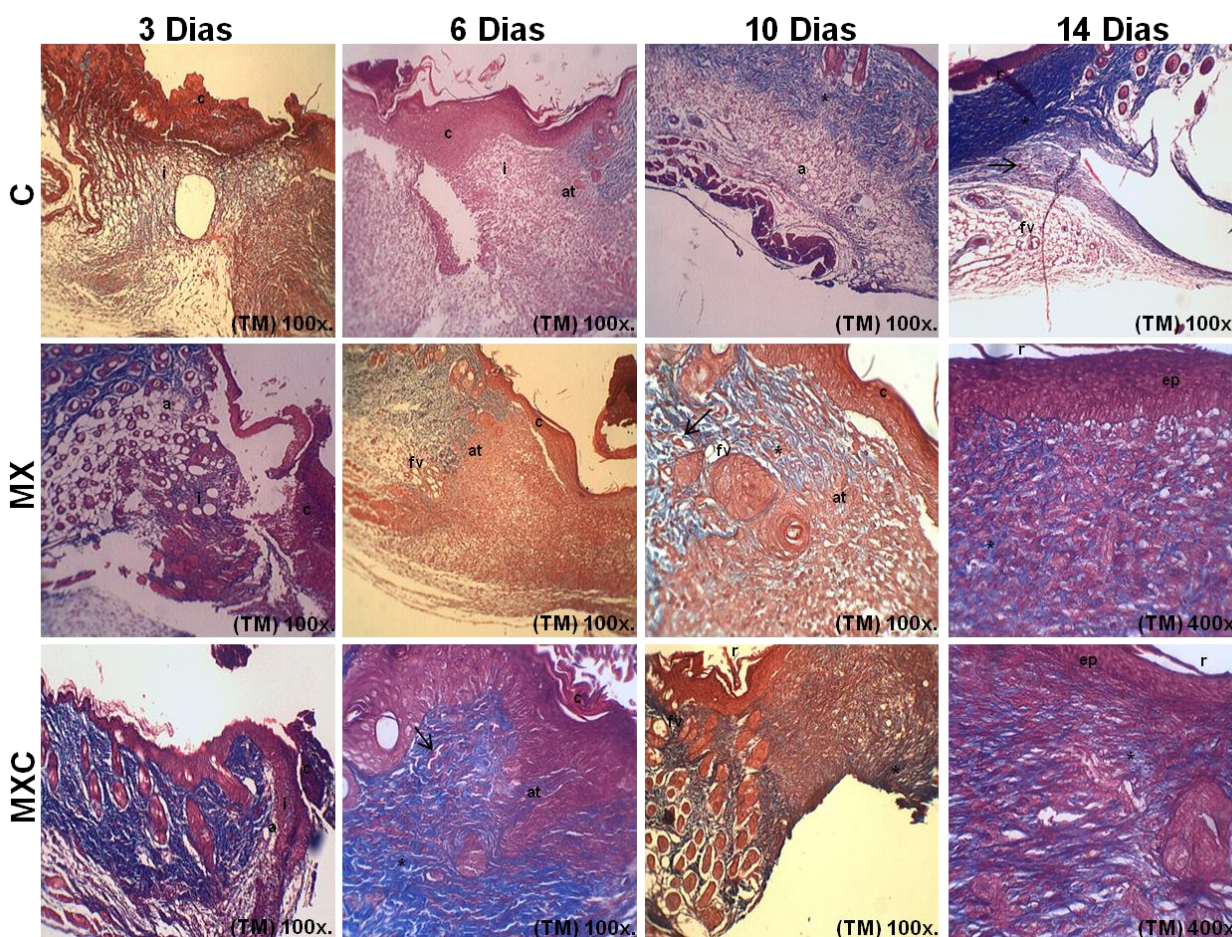


Figura 3. Fotomicrografia das lesões cirúrgicas na pele de camundongos tratados com os grupos (C) NaCl 0,15M, (MX) membrana de xiloglucana e (MXC) membrana de xiloglucana com ConA. (TM) 100 x e (TM) 400x corado com tricrômio de masson, com aumento de 100 e 400 vezes, respectivamente. Observações das lâminas: *c*, crosta; *i*, infiltrado inflamatório; *at*, área de transição; *a*, angiogênese; *r*, reepitelização; *fv*, tecido granulação fibrovascular; *ep*, epiderme; *seta*, fibroblastos e *asterisco*, fibras colágenas.

3.3 Citocinas

Em resposta a inflamação ocorre a modulação de uma rede de citocinas envolvidas no processo de cicatrização. O perfil de citocinas identificadas no soro dos animais tratados com os grupos C, MX e MXC (figura 4), apresentou a produção de citocinas inflamatórias IFN- γ IL-1 β , IL-6 e IL-12 e TNF- α diminuída no grupo de animais tratados com MXC, é importante salientar que para a citocina IL-6, a síntese só ocorreu entre os dias 3 e 10. As citocinas, são necessárias para estimular a fibroplasia e angiogênese, um processo em que os novos vasos sanguíneos são formados a partir de pré-existentes. Durante a angiogênese, a membrana basal vascular e a fibrina começam a

migrar para a matriz e para se proliferar pela formação de novos vasos do tipo capilar¹⁹. A proliferação dos fibroblastos é importantes para a produção da matriz extracelular²⁰.

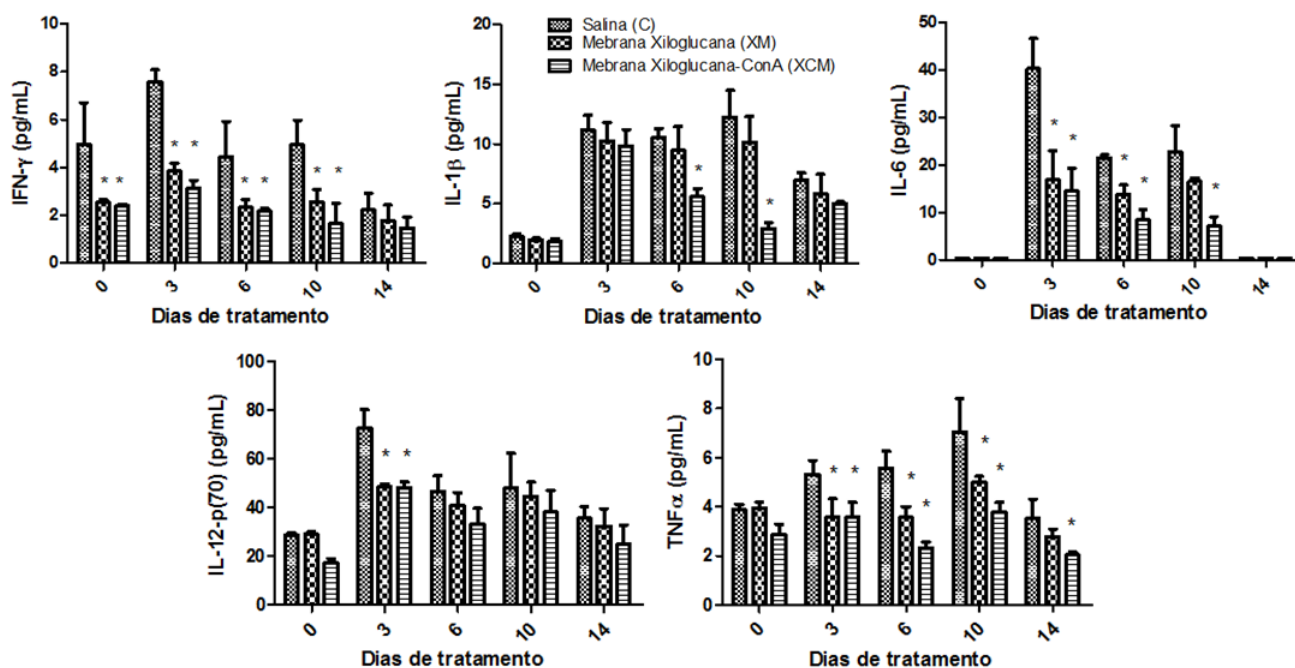


Figura 4. Perfil de citocinas identificadas no soro dos animais tratados com os grupos C, MX e MXC pelo um período de 14 dias.

3.4 Proteôma sérico

O perfil proteico obtido a partir do soro dos animais tratados com o MXC comparado com os grupos C e MC (Figura 5) e a identificação de 7 proteínas diferencialmente expressas (Tabela 1) foi caracterizado pela análise de proteômica.

Essas proteínas estão intimamente ligadas com o processo inflamatório, atuando em diversas vertentes a fim de retardar a inflamação e diminuir o dano caudado pela lesão. Elas foram identificadas nominalmente como: α 1 antitripsina, serinopeptidase, proteína ligadora da vitamina D e hemopexina, que apresentaram um aumento da expressão; apolipoproteína A1, albumina sérica e transferrina sérica, cuja expressão diminuiu durante a fase inflamatória.

Tabela 1. Identificação das proteínas séricas de camundongos tratados com os grupos C, MX e MXC com expressão diferencial identificada.

Spot	Identidade	Organismo	Acesso	Score	pI	Mr	Regulação
1	apolipoprotein A-I precursor	Mus musculus	gi 109571	165	5.52	30.3	diminuiu
2	serum albumin precursor	Mus musculus	gi 163310765	107	5.75	70.7	diminuiu
3	alpha-1 antitrypsin precursor	Mus musculus	gi 309079	90	5.33	46	aumentou
4	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K	Mus musculus	gi 18044689	138	5.05	46.9	aumentou
5	vitamin D-binding protein	Mus musculus	gi 193446	101	5.26	54.6	aumentou
6	Hemopexin	Mus musculus	gi 15030012	88	7.92	52	aumentou
7	serotransferrin precursor	Mus musculus	gi 20330802	106	6.94	78.8	diminuiu

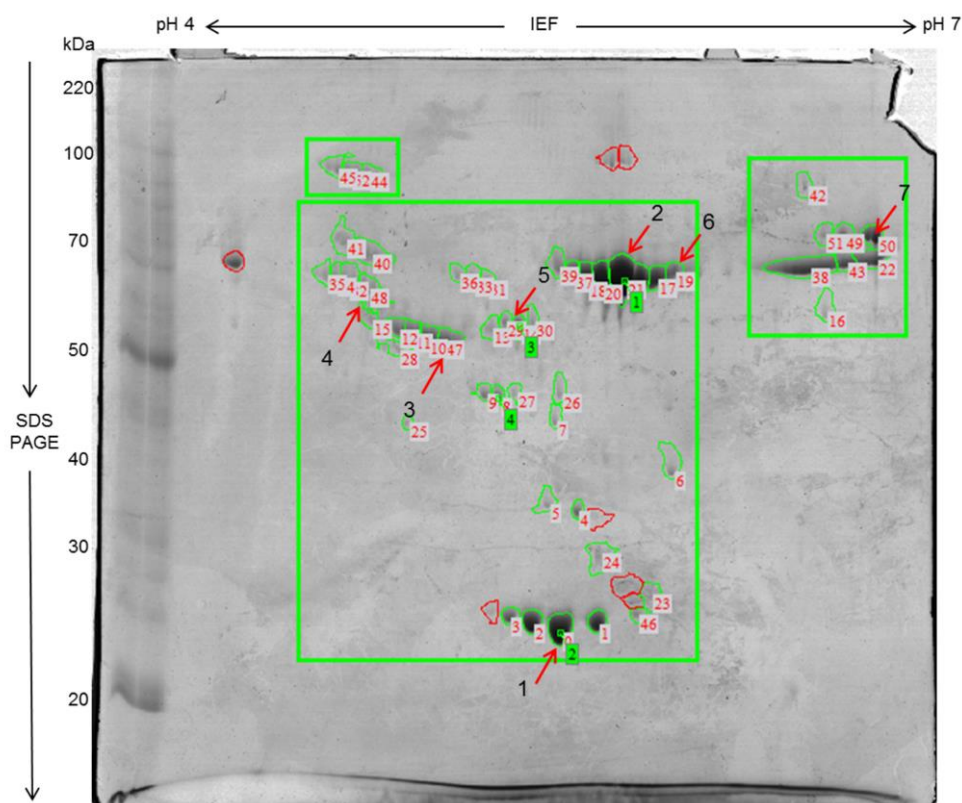


Figura 5. Gel representativo do proteôma sérico de animais tratados com os grupos C, MX e MXC. As setas indicam proteínas diferencialmente expressas entre os grupos e os tempos analisados.

Inibidores de proteases fazem parte de um grupo de proteínas, cuja função é neutralizar as atividades de enzimas proteolíticas durante o processo inflamatório²¹. A $\alpha 1$ antitripsina (spot 3) integra o principal grupo de inibidores que junto com inibidores de serinopeptidases (spot 4), tem sua expressão aumentada durante a fase inflamatória nos animais tratados com MXC. Juntas elas atuam limitando o dano tecidual causado pela lesão²².

A vitamina D controla a concentração sérica de cálcio e mantém a sua homeostase e contribui com a imunomodulação do sistema de reparo tecidual. A proteína ligadora da vitamina D (spot 5) é primariamente encontrada no plasma e tem como principal função o transporte da vitamina D no organismo. Entretanto, ela desempenha função adicional de impedir a polimerização da actina e ativar os macrófagos²³. O aumento da expressão dessa proteína em resposta a lesão cutânea pode estar relacionada como o equilíbrio de da actina na pele e a ativação imunológica necessária das células de defesa para a cicatrização do ferimento.

Dubois et al.²⁴ demonstraram o efeito estimulante da ConA para a produção de metaloproteinase (MMP). De acordo com Nagase et al.²⁵, esta MMP participa do fenômeno de cicatrização de lesões, sendo responsável, pela metabolização da elastina, do colágeno tipo IV e outras moléculas da matriz extracelular. A principal função das MMPs é promover a degradação da

matriz extracelular, possibilitando o remodelamento vascular²⁶. Além disso, degradam o colágeno tipo IV e rompem a aderência dos queratinócitos às fibras colágenas possibilitando que avancem pelo leito ulceral²⁷. O domínio hemopexina (spot 6) está presente em todas as metaloproteases, portanto o aumento da expressão desse domínio está diretamente relacionado com o aumento da expressão desse grupo de proteases.

O colesterol de alta densidade (HDL) é conhecido por sua função de transporte reverso do colesterol de baixa densidade e por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante e antitrombóticas²⁸. Entretanto é conhecido que durante processos inflamatórios o HDL pode sofrer modificações e tornar-se pro-inflamatório²⁹. Essa reversão de função explica a diminuição da expressão da apolipoproteína A-1 (spot 1), durante o processo inflamatório nos animais tratados com MXC, afim de beneficiar o processo e cicatrização.

A albumina (spot 2), proteína mais abundante no plasma, aproximadamente 60% da concentração total de proteínas do plasma. É sintetizada exclusivamente pelo fígado e suas funções compreendem transporte de diferentes substâncias e manutenção da pressão oncótica plasmática. Doenças inflamatórias são as maiores causas da diminuição da concentração plasmática de albumina, devido a hemodiluição, aumento de permeabilidade vascular, aumento do consumo celular local e menor síntese, decorrente da inibição por citocinas²².

A transferrina (spot 7) é uma glicoproteína responsável pelo transporte de íons ferro na circulação, cujo teor sérico tende a decrescer na presença de condição inflamatória, durante a inflamação os íons de ferro são transportados para o fígado, diminuindo assim, a disponibilidade de ferro, retardando infecções²¹.

3. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra que a aplicação de membranas ativas à base de xiloglucana com ConA incorporada, foi eficaz para a reparação de lesões experimentais em camundongos em um breve período de tempo. Sugere-se assim que essa membrana pode ser utilizada como um composto de cicatrização no futuro, contribuindo para a reabilitação de lesões cutâneas.

4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro pelas bolsas de investigação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Somos gratos ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

(CETENE) e ao laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo acesso a seus instalação e assistência.

5. REFERÊNCIAS

- [1]. Melo, C.M.L, H. Melo, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.B. da Silva, V.R.A. Pereira, Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice, *Scand J Immunol* **2011**,73(2) 112-21.

- [2] Zhong W, Xing MMQ, Maibach HI. Nanofibrous materials for wound care. *Cutan Ocul Toxicol* **2010**;29:143–52.

- [3] Hirose K, Onishi H, Sasasatsu M, Takeshita K, Kouzuma K, Isowa K, et al. In vivo evaluation of kumazasa extract and chitosan films containing the extract against deep skin ulcer model in rats. *Biol Pharm Bull* **2007**;30:2406–11.

- [4] Cochrane C, Rippon MG, Rogers A, Walmsley R, Knottenbelt D, Bowler P. Application of an in vitro model to evaluate bioadhesion of fibroblasts and epithelial cells to two different dressings. *Biomaterials* **1999**;20:1237–44.

- [5] Ferreira A.S., et al. Measurement of healing area using planimetry after applying low-intensity ultrasound to the skin of rats. *Revista Brasileira Fisioterapia*, **2008**, v. 12, n. 5, p. 351-8.

- [6] Sezer, A.D. et al. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PHARMSCITHEC*, **2007**, v.8, n.2.

- [7] Schirato, G.V. F.M.F. Monteiro, F.O. Silva, J.L. Lima-Filho, A.M.A. Carneiro-Leão, A.L.F. Porto. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas, *Ciênc Rural*, **2006**, 36(1) 149–54.

- [8] Monteiro, F.M.F G.M.M. Silva, J.B.R. Silva, C.S. Porto, L.B. Carvalho Júnior, J.L. Lima Filho, A.M.A. Carneiro-Leão, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.L.F. Porto, Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing, *Process Biochem*, **2007**, 42 884–888.

- [9] Lucyszyn, N. A.F. Lubambo, K.F. Matos, I. Marvilla, C.F. Souza, M.-R. Sierakowski, Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds, *Materials Science and Engineering C* 29, **2009**, 552–558.
- [10] Avachat, A. M., Kishor, K. N., Wagh, G. V. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate *Carbohydrate Polymers* 91, **2013**, 537– 542.
- [11] Simkovic, I. Unexplored possibilities of all-polysaccharide composites *Carbohydrate Polymers* 95, **2013**, 697– 715
- [12] Agrawal BBL, Goldstein IJ Protein carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on crosslinked dextran gels. *Biochim Biophys Acta*, **1967**, 147:262–271.
- [13] Andrade CAS, Baszkin A, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Melo CP. Dielectric properties of Bauhinia monandra and Concanavalin A lectin monolayers. Part I. *J Colloid Interface Sci*, **2005**;289:371–8.
- [14] Pereira, E.M.A. M.-R. Sierakowski, T.A. Jó, R.A. Moreira, A.C.O. Monteiro-Moreira, R.F.O. Franc, a, B.A.L. Fonseca, D.F.S. Petri, *Colloids Surf. B* 66, **2008**, 45–52.
- [15] Valenga, F. Denise F.S. Petri, Neoli Lucyszyn, Tatiane A. Jó, Maria Rita Sierakowski, Galactomannan thin films as supports for the immobilization of Concanavalin A and/or dengue viruses *International Journal of Biological Macromolecules*, **2011**.
- [16] Ramsey, D. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *Am J Vet Res*, **1995**, 56, 941–949.
- [17] Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghiggeri, G. M.; Carnemolla, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. **2004**, 25, 1327–1333.
- [18] Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen J. V.; Mann, M. In-gel digestion form mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. **2007**, 1, 2856-2860.

- [19] Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI, McQuillan A, Staton J, Yi Q. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke*. **2003**; 34:2132–2137.
- [20] Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, Montemurro D, Abatangelo G, Cortivo R. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. **2005**; 26:7038–7045.
- [21] Di Filippo, P. A.; Nogueira, A. F. S.; Santana, A. E. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, 1-glicoproteína ácida, transferrina e 1-antitripsina, em equinos com cólica. *Ciência Rural*. **2011**, 41 2108-2113.
- [22] Rosa Neto, N. S.; Carvalho J. F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. *Revista Brasileira de Reumatologia*. **2009**, 49, 413-430.
- [23] Eloranta, J. J.; Wenger, C.; Mwinyi, J.; Hiller, C.; Gubler, C.; Vavricka, S. R.; Fried, M.; Kullak-Ublick, G. A.; Swiss, I. B. D. Cohort Study Group. Association of a common vitamin D-binding protein polymorphism with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics and Genomics*, **2011**, 21, 559-564.
- [24] Dubois B, Peumans WJ, Van Damme EJM et al Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. **1998**, FEBS Lett 427:275–278
- [25] Nagase H, Visse R, Murphy G Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc*, **2006**, Res 69: 562–573
- [26] Galis, Z. S.; Khatri, J. J.; Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circulation Research*, **2002**, 90, 251-262.
- [27] Li, J.; Chen, J.; Kirsner, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, **2007**, 25, 9-18.
- [28] Ansell, B. J.; Fonarow, G. C.; Fogelman, A. M. High-density Lipoprotein: Is It Always

Atheroprotective? *Current Atherosclerosis Reports*, **2006**, 8, 405-411.

[29]Ansell, B. J.; Fonarow, G. C.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Modifying the Anti-inflammatory Effects of High-density Lipoprotein. *Current Atherosclerosis Reports*, **2007**, 9, 57-63.

CONCLUSÕES

O polissacárideo extraído das sementes de *H. courbaril* var *courbaril* foi isolado com sucesso e o rendimento do processo extração foi superior comparado aos relatados na literatura. A caracterização foi realizada por difração de raios-X, FTIR, RMN e composição monossacarídica e confirmou que o polissacárido possui uma estrutura bem definida de uma espinha dorsal de glucose com ramificações de unidades terminais de xilose e galactose. A sua estrutura é semelhante a outras xiloglucanas mencionadas na literatura. As atividades biológicas e suas características reológicas sugerem uma ampla aplicabilidade da xiloglucana como um agente com possível aplicação biotecnológica. As membranas de xiloglucana foram usadas como matriz para a incorporação da lectina ConA. Em geral, a incorporação de ConA em membranas de xiloglucana (MXC) resultou no aumento da resistência à tracção (TS) e da opacidade em relação as membranas de xiloglucan sem ConA (MX), não apresentaram toxicidade e se mantiveram estável durante 34 dias a 4 ° C com 100% da bioactividade. Análises de FTIR sugerem diferentes interações químicas que ocorrem entre os grupos funcionais de ConA e grupos ativos da membrana xiloglucano. Atualmente, tem sido intensificada a pesquisa com substâncias biocompatíveis, as quais tendem a produzir efeitos menos agressores ao organismo do que os compostos sintéticos. Persistindo a busca por substâncias que sejam úteis no processo de reparação tissular, mesmo com a existência de um vasto arsenal terapêutico direcionado ao tratamento de lesões cutâneas. A avaliação dessas membranas como curativo tópico, demonstrou um potencial para novo biomaterial no campo de reparação de tecidos.