



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE**  
**ANGIOGÊNICA DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE ALGINATO E**  
**CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO LECTINA DE *Canavalia ensiformis***

**FORTALEZA**

**2026**

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANGIOGÊNICA DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE ALGINATO E  
CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO LECTINA DE *Canavalia ensiformis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira.

FORTALEZA

2026

MARIA HELENA CRUZ DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANGIOGÊNICA DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE ALGINATO E  
CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO LECTINA DE *Canavalia ensiformis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 23/02/2026.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Claudener Souza Teixeira (Orientador)  
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luís Cláudio Nascimento da Silva  
Universidade Ceuma (UNICEUMA)

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Cléver Gomes Cardoso  
Universidade Federal de Goiás (UFG)

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Rômulo Farias Carneiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha mãe, irmã, irmão e avós. Por todo amor e momentos grandiosos.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus/a, este como uma energia contida em milhares de partículas dispersas de maneira coordenada presente na vida e no viver, em cada canto do Universo, agradecida estou, por ter me dado motivos para continuar e persistir.

Ao apoio da minha família, em especial a minha mãe Elizângela, uma mulher guerreira, minha irmã Emanuelle, meu irmão Rafael, aos meus avós José Façanha e Francisca e da minha Nala, vocês são e sempre serão minha eterna fonte de amor.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Claudener Souza Teixeira um ser iluminado de destreza e sabedoria, por cada conhecimento transmitido, agradeço pela paciência e confiança, és fonte de inspiração no meio acadêmico, sua orientação foi essencial para meu desenvolvimento na área da pesquisa e da vida.

Ao LaBEM, que é uma parte muito importante da minha trajetória e àqueles que já passaram pelo laboratório, em especial Renato, pelos momentos compartilhados e Israel pela ajuda na pesquisa. Ana Lúcia, uma amiga especial que conto com a sua amizade desde a graduação, me ajudou em todos os momentos possíveis e impossíveis, minha gratidão é imensa. Romério, um amigo incrível que a pesquisa proporcionou, obrigada por todos momentos, sorrisos, conversas e sabedoria compartilhada.

A Dr<sup>a</sup> Neudymara por todos conselhos, tempo e dedicação desde o mestrado, com idas e vindas, foi uma pessoa essencial nesse processo da minha vida.

Aos professores e pesquisadores que fizeram com que este trabalho se realizasse, por todo esforço e dedicação; ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Wanius Garcia da Universidade Federal do ABC, a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lee Chen-Chen da UFGO, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Edison Silva da UFPI por disponibilizarem seu tempo, pesquisadores e acolherem essa ideia, esboço minha sincera gratidão.

A Universidade Federal do Ceará, em específico ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Nunca pensei em ir tão longe, advindo da minha realidade, assim como a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de doutorado sem ela essa meta como um sonho não teria sido possível. E CNPq por acreditar e financiar nossas pesquisas no LaBEM.

Por fim, expresso aqui minha gratidão por aqueles que estiveram comigo nesta longa caminhada, foram necessários cada gesto de carinho, conversas, vivências...

**Simplesmente, Meu Muitíssimo Obrigada!**

“Exausta, a pobre Lesma da vanglória, ao atingir o cume do obelisco, disse, olhando da própria baba o risco: Meu rastro ficará também na História!”

Trilussa

## RESUMO

A formação de um sistema vascular funcional é um desafio reconhecido, com isso, a engenharia de tecidos tem explorado estratégias químicas e físicas para promover a neovascularização. A angiogênese induzida por biomateriais ocorre predominantemente por meio da formação de novos vasos a partir de estruturas vasculares preexistentes, sendo regulada pela migração, proliferação e diferenciação de células endoteliais. Surgem então técnicas com o intuito de induzir a revascularização, dentre elas os polímeros naturais, produtos biodegradáveis capazes de regenerar tecidos por meio da interação de sua biodegradação com células imunes. As lectinas vegetais, por sua vez, são capazes de modular distintas respostas celulares e apresentam potencial angiogênico, são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem e se ligam reversivelmente a moléculas específicas de carboidratos. O objetivo deste trabalho é incorporar a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) em filmes de alginato e carboximetilcelulose para promover vias de angiogênese e induzir vascularização como proposta terapêutica e farmacológica. A caracterização dos filmes e os testes físico-químicos demonstraram a eficiente incorporação da lectina ao filme, conforme observado na análise por calorimetria diferencial de varredura e nos espectros de FT-Raman. Além da capacidade de retenção significativamente prolongada da ConA no filme observada pela análise da atividade hemaglutinante, os ensaios de MEV e perfil de rugosidade que demonstraram a capacidade de adesão dos filmes. A atividade angiogênica foi confirmada por meio do ensaio MCA e os ensaios imuno-histoquímicos mostraram um aumento na expressão dos fatores angiogênicos TGF- $\beta$  e VEGF. Esses resultados demonstram que os biopolímeros utilizados representam uma alternativa eficaz na indução da angiogênese, abrindo caminho para futuras pesquisas no desenvolvimento de biopolímeros terapêuticos e farmacológicos.

**Palavras-chave:** ConA; biopolímeros; neovascularização; TGF- $\beta$ ; VEGF.

## ABSTRACT

The formation of a functional vascular system is a recognized challenge; therefore, tissue engineering has explored chemical and physical strategies to promote neovascularization. Angiogenesis induced by biomaterials occurs predominantly through the formation of new vessels from pre-existing vascular structures, regulated by the migration, proliferation, and differentiation of endothelial cells. Techniques aimed at inducing revascularization have emerged, including natural polymers, biodegradable products capable of regenerating tissues through the interaction of their biodegradation with immune cells. Plant lectins, in turn, are capable of modulating distinct cellular responses and exhibit angiogenic potential; they are proteins or glycoproteins of non-immunological origin that recognize and reversibly bind to specific carbohydrate molecules. The objective of this work is to incorporate the lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) into alginate and carboxymethylcellulose films to promote angiogenesis pathways and induce vascularization as a therapeutic and pharmacological approach. The characterization of the films and the physicochemical tests demonstrated the efficient incorporation of the lectin into the film, as observed in the differential scanning calorimetry analysis and the FT-Raman spectra. In addition to the significantly prolonged retention capacity of ConA in the film observed by the hemagglutinating activity analysis, SEM and roughness profile assays demonstrated the adhesion capacity of the films. Angiogenic activity was confirmed by the CAM assay, and immunohistochemical assays showed an increase in the expression of the angiogenic factors TGF- $\beta$  and VEGF. These results demonstrate that the biopolymers used represent an effective alternative in inducing angiogenesis, paving the way for future research in the development of therapeutic and pharmacological biopolymers.

**Key-words:** ConA; biopolymers; neovascularization; TGF- $\beta$ ; VEGF.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação dos biomateriais naturais utilizados como plataformas bioativas ao longo dos anos.....	21
Figura 2 –	Estrutura química do alginato.....	23
Figura 3 –	Representação gráfica de hidrogéis e compostos bioativos utilizados na cicatrização de lesões cutâneas.....	24
Figura 4 –	Estrutura química da carboximetilcelulose sódica e suas aplicações biológicas.....	25
Figura 5 –	Imagem da planta de <i>Canavalia ensiformes</i> , demonstrando suas respectivas (A) inflorescência, (B) vargens e (C) sementes.....	36
Figura 6 –	Estrutura tridimensional da lectina de <i>Canavalia ensiformes</i> (ConA). (A) Representação da estrutura monomérica (PDB ID: 1JBC) com os íons cálcio (verde) e manganês (roxo). (B) Representação tetramérica (PDB ID: 9IJA) sem ligantes.....	38
Figure 7 –	Visual appearance of cross-linked alginate/CMC films with or without ConA. (A) Control: alginate/CMC film at 2.5% cross-linking containing NaCl; (B) ConA 50 $\mu\text{g}$ in 2.5% cross-linking; (C) ConA 200 $\mu\text{g}$ at 2.5% cross-linking; (D) control at 5% cross-linking; (E) ConA 50 $\mu\text{g}$ in 5% cross-linking; (F) ConA 200 $\mu\text{g}$ in 5% cross-linking.....	52
Figure 8 –	Assessment of the hemagglutinating activity of films CMC/alginate (1:1) containing (A) 2.5% cross-linking control; (B) 2.5% crosslinking ConA 50 $\mu\text{g}$ ; (C) 2.5% cross-linking ConA 200 $\mu\text{g}$ (D) 5% cross-linking control; (E) 5% cross-linking ConA 50 $\mu\text{g}$ in (F) 5% cross-linking ConA 200 $\mu\text{g}$ ...	55
Figure 9 –	Film hemagglutinating activity (ConA) titers after the two types of cross-linking processes.....	56
Figure 10 –	DSC thermograms. (A) Group I: alginate/CMC film with NaCl and 2.5% or 5% of $\text{CaCl}_2$ . (B) Group II: alginate/CMC film with ConA and 2.5% or 5% of $\text{CaCl}_2$ . (C) Group III: alginate/CMC film with NaCl and ConA and 2.5% or 5% of $\text{CaCl}_2$ .....	57
Figure 11 –	FTIR analyzes. Group I: (A) spectra of alginate/CMC film with NaCl and 2.5% $\text{CaCl}_2$ , and (B) 5% of $\text{CaCl}_2$ . Group II: (C) spectra of alginate/CMC film with lectin ConA with 2.5%, and (D) 5% of $\text{CaCl}_2$ . Group III: (E) spectra alginate/CMC film with NaCl and lectin ConA with 2.5%, and (F) 5% of $\text{CaCl}_2$ .....	59

- Figure 12 – Scanning electron microscopy of the films: ConA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with 2.5% (A); ConA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with 5.0% (B); ConA (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with 2.5% (C); ConA (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with 5.0% (D); control group with 2.5% (E); control group with 5.0% (F)..... 60
- Figure 13 – Confocal laser scanning microscopy images showing surface roughness ( $R_a$ ) of the films: (A,B) alginate/CMC films with NaCl and 2.5% or 5%  $\text{CaCl}_2$ , respectively; (C,D) alginate/CMC films with ConA and 2.5% or 5%  $\text{CaCl}_2$ , respectively; (E,F) alginate/CMC films with NaCl and ConA and 2.5% or 5%  $\text{CaCl}_2$ , respectively..... 62
- Figure 14 – Angiogenic effect of ConA by chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. (A) Representative images of different CAM after 72 h of treatments. (B) Average vascularization percentage obtained from each treatment by ImageJ software. NC: negative control: cross-linking solution + 150 mM NaCl; ConA: cross-linking solution + concanavalin A lectin (50 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 150 mM NaCl. DE: healing oil Dersani (angiogenesis inducer). ANOVA and posthoc Tukey test. \*Significant difference compared to the negative control 2.5% ( $p < 0.05$ ); § significant difference compared to the negative control 5% ( $p < 0.05$ )..... 63
- Figure 15 – Representative photomicrograph of chick embryo chorioallantoic membranes stained by hematoxylin–eosin (HE), obtained from different treatment groups. (A) Negative control 2.5%; (B) negative control 5%; (C) ConA 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2.5%; (D) ConA 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5%; (E) ConA 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2.5%; (F) ConA 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5%. (G) Healing oil Dersani (angiogenesis inducer). Black arrow: fibroblasts; gray arrow: new vessels; white arrow: inflammatory cells; asterisk: pre-existing vessels; arrowhead: CAM thickening..... 65
- Figure 16 – Immunodetection of angiogenic factors in chick embryo chorioallantoic membranes treated with ConA. (A) Immunostaining of vascular endothelial growth factor (VEGF); (B) immunostaining of transforming growth factor-beta ( $\text{TGF-}\beta$ ). The mean values obtained from each treatment were used to determine the expression (%). \*Significant difference compared to the negative control 2.5% ( $p < 0.05$ ); § significant difference compared to the negative control 5% ( $p < 0.05$ )..... 68

## LISTA DE TABELAS

Table 1 – Experimental Groups of Alginate/CMC Films with Different CaCl <sub>2</sub> Cross-Linking and ConA Treatments.....	47
Table 2 – Film Thickness (ConA) of Alginate and CMC (1:1) Obtained with Cross-Link Concentrations of 2.5% and 5% <sup>a</sup> .....	52
Table 3 – Degree of Swelling and Mass Loss of Alginate and CMC (ConA) Film (1:1) Obtained with Crosslinking Concentrations of 2.5% and 5% <sup>a</sup> .....	53
Table 4 – Means ± Standard Deviation of Parameters Analyzed in Chick Embryo Chorioallantoic Membranes (CAM), Treated with Different Concentrations of ConA by AngioQuant Software <sup>a</sup> .....	64
Table 5 – Histological Analysis of Chick Embryo Chorioallantoic Membranes (CAM) <sup>a,b</sup> .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
Alg	Alginato
Alg-CS	Compósito de alginato e sulfato de condroitina
Arg-Gly-Asp	Sequência peptídica arginina–glicina–aspartato
AVC	Acidente vascular cerebral
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
CAM	Membrana corioalantoide
CEs	Células endoteliais
CMC	Carboximetilcelulose
ConA	Concanavalina A
CS	Quitosana ( <i>chitosan</i> )
CS	Sulfato de condroitina
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
Ea.Hy926	Linha celular endotelial híbrida humana
EPCs	Células progenitoras endoteliais
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FG	Fator de crescimento de fibroblastos
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformador de Fourier
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GelMA	Gelatina metacrilada
HÁ	Ácido salicílico
hPSC	Células-tronco pluripotentes humanas
HUVECs	Células endoteliais da veia umbilical humana
hypo-ADSC-Exos	Exossomos derivados de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo sob condições hipóxicas
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IKVAV	Sequência peptídica isoleucina–lisina–valina–alanina–valina
iPS	Células-tronco pluripotentes induzidas

iPS-NPCs	Células progenitoras neurais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas
MBG	Grafeno modificado com metal
MCA	Membrana corioalantoide
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP	Metaloproteinase da matriz
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MSCs	Células-tronco mesenquimais
MT1-MMP	Metaloproteinase de matriz tipo 1
Mw	Massa molecular ( <i>molecular weight</i> )
NO	Óxido nítrico
PCL	Poli(caprolactona)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF <sub>aa</sub>	Fator de crescimento derivado de plaquetas AA
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas BB
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Poli(etileno glicol)
PGA	Poli(ácido hidroxiglicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
pAkt	Proteína quinase B fosforilada
pERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1/2 fosforilada
pH	Potencial hidrogeniônico
PyMOL	<i>Python Molecular Graphics System</i>
RGD	Sequência peptídica arginina–glicina–aspartato
RIP	Proteínas inativadoras de ribossomos
RNA	Ácido ribonucleico
SDF-1	Fator derivado de células do estroma 1
SLIT3	Proteína <i>SLIT homolog 3</i>
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
TLR	Receptor do tipo Toll
TLR-2	Receptor do tipo Toll 2
TLR-6	Receptor do tipo Toll 6

TxLCI	Lectina do bulbo de tulipa ( <i>Tulipa</i> × <i>gesneriana</i> lectin I)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF <sub>a</sub>	Fator de crescimento endotelial vascular A
YIGSR	Sequência peptídica tirosina–isoleucina–glicina–serina–arginina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Biomateriais poliméricos naturais como plataformas bioativas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Alginato em aplicações biomédicas.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Carboximetilcelulose em aplicações biomédicas.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Alginato e carboximetilcelulose combinados em aplicações biomédicas...</b>	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Angiogênese e limitações de terapias convencionais.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6</b>	<b>Alternativas baseadas em biomateriais para estímulo angiogênico.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.1</b>	<i>Polímeros sintéticos no estímulo angiogênico.....</i>	<i>29</i>
<b>2.6.2</b>	<i>Polímeros naturais no estímulo angiogênico.....</i>	<i>31</i>
<b>2.6.3</b>	<i>Ensaio da membrana corioalantoide como modelo para análises em polímeros naturais.....</i>	<i>33</i>
<b>2.7</b>	<b>Classificação estrutural das lectinas.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7.1</b>	<i>Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i> – ConA.....</i>	<i>35</i>
<b>2.7.2</b>	<i>Concanavalina A – Breve histórico estrutural.....</i>	<i>36</i>
<b>2.7.3</b>	<i>Concanavalina A como moduladora da angiogênese.....</i>	<i>38</i>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II – ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Methods.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Chemicals.....</i>	<i>45</i>
<b>4.2.2</b>	<i>Purification, production, and characterization of films.....</i>	<i>45</i>
<b>4.2.2.1</b>	<i>Purification of <i>Canavalia ensiformis</i> seeds – ConA.....</i>	<i>45</i>
<b>4.2.2.2</b>	<i>Formulation of a cross-linked Alginate + film carboxymethylcellulose incorporated with the ConA lectin.....</i>	<i>46</i>

4.2.2.3	<i>Group arrangement</i> .....	47
4.2.2.4	<i>Visual appearance</i> .....	47
4.2.2.5	<i>Thickness of films</i> .....	47
4.2.2.6	<i>Swelling</i> .....	47
4.2.2.7	<i>Mass loss</i> .....	48
4.2.2.8	<i>Hemagglutinating activity</i> .....	48
4.2.2.9	<i>Title of hemagglutination activity</i> .....	48
<b>4.2.3</b>	<b><i>Physical characterization</i></b> .....	<b>48</b>
4.2.3.1	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> .....	48
4.2.3.2	<i>FTIR spectra</i> .....	49
4.2.3.3	<i>Scanning Electron Microscopy</i> .....	49
4.2.3.4	<i>Rugosity Profile</i> .....	49
<b>4.3.3</b>	<b><i>Angiogenic Activity</i></b> .....	<b>63</b>
4.3.3.1	<i>ConA angiogenic activity in CAM assay</i> .....	63
4.3.3.2	<i>ConA modulates VEGF and TGF-<math>\beta</math> expression in CAM</i> .....	67
<b>5</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>
	<b>APENDICE A – DADOS SUPLEMENTARES</b> .....	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente os tratamentos clínicos para patologias que envolvem o processo de angiogênese são limitados, recorrendo principalmente a terapias medicamentosas convencionais (Pande et al., 2010). Nesse critério, abordagens físicas como biomateriais de hidrogéis (Li et al., 2023), biopolímeros, scaffold (Tomić et al., 2023), cerâmicas (Xue et al., 2022; Mirkhalaf et al., 2023), microesferas (Peirce; Price; Skalak, 2003) representam uma alternativa promissora para superar as limitações associadas à vascularização insuficiente (Mastrullo et al., 2020).

Uma das principais abordagens para estimular a angiogênese baseia-se na indução química promovida pela liberação controlada de moléculas bioativas e de biomateriais. Os biomateriais como os polímeros e hidrogéis são materiais versáteis, aplicados em áreas biomédicas, farmacêuticas e ambientais, se destacando por suas propriedades benéficas e potencial para formar hidrogéis funcionais (Dodero et al., 2018; Kalia; Avérous, 2011).

Dentre esses biomateriais, destaca-se o alginato, um hidrogel à base de polissacarídeos amplamente utilizado na regeneração de tecidos devido à sua hidrofilicidade (Pawar; Edgar, 2012; Malektaj et al., 2023); outro é a carboximetilcelulose que apresenta interesse por sua biodegradabilidade, facilidade de produção e funcionalização e evidente absorção (Dodero et al., 2020; Tarusha et al., 2018). A característica em comum destes polímeros é a biocompatibilidade, um requisito que favorece a integração com o tecido hospedeiro e o processo regenerativo, pois permite reagir com os tecidos e não ser rejeitado por eles (Williams, 2008).

A produção de filmes a partir desses polímeros se caracteriza como finos e transparentes que, devido à sua matriz, apresentam diversos microporos que permitem a migração de moléculas e servem como veículo para substâncias ativas (Mohamed; El-Sakhawy; El-Sakhawy M., 2020). A exemplo disso se tem a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA) que apresentou eficiente com as interações com polímeros de alginato (Macedo et al., 2022).

A Concanavalina A (ConA) é uma lectina vegetal extraída das sementes de *Canavalia ensiformes*, essa lectina apresentou estudos já descritos com sua atividade angiogênica em células endoteliais (Huldani et al., 2022; Li et al., 2022).

Como exemplo, Macedo e colaboradores (2022) destacam o uso de hidrogel à base de alginato contendo ConA e o fármaco gentamicina para aplicações em curativos. Os resultados que foram obtidos revelaram perspectivas promissoras no tratamento de lesões cutâneas, demonstrando atividade antimicrobiana eficiente.

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem propriedades hemaglutinante, obtiveram reconhecimento científico sem precedentes devido à sua alta especificidade e seletividade (Lei; Chang, 2009), sendo a ConA a mais representativa das lectinas de origem vegetal.

Estratégias que envolvam a indução da angiogênese e vascularização precisam ser investigadas, este estudo apresenta uma alternativa atual para este problema na indução da angiogênese, abrindo caminho para futuras pesquisas no desenvolvimento de biopolímeros a base de alginato e carboximetilcelulose incorporados a moléculas de ConA como proposta biotecnológica.

## **2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Biomateriais poliméricos naturais como plataformas bioativas**

Há milênios, os curativos têm sido empregados como estratégia fundamental para a proteção de tecidos lesionados e principalmente como agentes na promoção do processo de cicatrização (Sen et al., 2009). Historicamente, materiais de origem natural, como o algodão, foram amplamente utilizados como coberturas para feridas, desempenhando funções primariamente físicas como a absorção de exsudatos e a formação de uma barreira externa protetora, frequentemente associada à formação de escara (Daristotle et al., 2020).

O uso de folhas, tecidos e preparações naturais, representavam as primeiras tentativas de se criar um ambiente favorável ao reparo tecidual, constituindo uma série de abordagens empíricas voltadas à redução da dor, à prevenção de infecções e à aceleração do fechamento tecidual, estabelecendo os fundamentos conceituais que orientaram o desenvolvimento subsequente de sistemas de cobertura para feridas (Li et al., 2023).

Atualmente, o tratamento de feridas na prática clínica é realizado por uma ampla variedade de curativos, que incluem desde coberturas tradicionais, como gazes, até sistemas mais complexos, como espumas poliméricas, hidrogéis e outras matrizes funcionais (Barros Almeida et al., 2021). Esses dispositivos tiveram uma relevante contribuição para avanços no controle do processo cicatricial, porém sua eficácia permanece limitada em situações caracterizadas por elevada complexidade biológica, como feridas crônicas ou refratárias, além de frequentemente não evitarem a formação de cicatrizes permanentes em lesões profundas (Hesseler; Shyam, 2019). Tais limitações refletem a inadequação de abordagens essencialmente passivas frente às exigências dinâmicas do reparo tecidual.

O avanço integrado do conhecimento em biologia, química e engenharia de materiais possibilitou não apenas a elucidação dos mecanismos responsáveis pelo desempenho dos materiais naturais tradicionalmente empregados no cuidado de feridas, mas também a proposição de estratégias para sua otimização racional. Esse progresso científico impulsionou o desenvolvimento de biomateriais poliméricos naturais concebidos como sistemas funcionalmente ativos, capazes de associar elevada biocompatibilidade, manutenção controlada da umidade e interação efetiva com o microambiente da ferida, promovendo condições mais favoráveis ao processo cicatricial (Joyce et al., 2021).

Dessa forma, o uso de abordagens baseadas exclusivamente na formação de barreiras secas retarda a proliferação e a migração de células epidérmicas e compromete a recuperação tecidual. Como resposta a esse problema, o uso de curativos úmidos passou a ser

amplamente recomendado como estratégia para acelerar o processo de cicatrização. Considerando que esses curativos permanecem em contato direto com o leito da ferida por períodos prolongados, os materiais empregados devem apresentar propriedades físico-químicas e biológicas compatíveis com o tecido lesionado, incluindo facilidade de remoção, capacidade de adaptação à superfície da ferida e potencial para liberação controlada de agentes terapêuticos, como antibióticos, visando ao tratamento de infecções microbianas e bacterianas (Costa et al., 2020; Dong; Guo, 2021; Singh; Sharma; Dhiman, 2013).

As primeiras estratégias de engenharia de tecidos voltadas à regeneração cutânea concentraram-se no uso de fatores de crescimento, células ou arcabouços isolados, apresentando limitações significativas, como vascularização deficiente, formação anormal de cicatrizes e perda sensorial, o que comprometeu a eficácia do processo cicatricial (Berthiaume; Maguire; Yarmush, 2011). Esses desafios reforçaram a necessidade de abordagens integradas capazes de atuar de forma mais abrangente sobre os múltiplos eventos biológicos envolvidos na regeneração tecidual.

Nesse cenário, o conceito de curativo avançado passou a incorporar a manutenção ativa do microambiente da ferida. No qual, tais sistemas devem permitir trocas gasosas adequadas, prevenir maceração da pele perilesional, favorecer o desbridamento autolítico e manter equilíbrio hídrico, fornecendo umidade a feridas secas e absorvendo exsudato excessivo em feridas úmidas. Além disso, devem funcionar como barreiras antimicrobianas, oferecer isolamento térmico e, sobretudo, modular processos-chave da cicatrização. Entre esses mecanismos destacam-se a indução de angiogênese em tecidos com perfusão comprometida, a regulação da resposta imune local, o estímulo à migração e proliferação de fibroblastos e queratinócitos e o controle de infecções, atributos centrais dos biomateriais poliméricos naturais concebidos como plataformas bioativas (Das; Baker, 2016).

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem não medicamentosa, projetadas para interagir de forma controlada com tecidos e fluidos corporais por um período prolongado e são capazes de reconstruir a estrutura e as funções de órgãos ou tecidos. São classificados como substâncias naturais ou sintéticas e possuem ampla utilização em dispositivos médicos, sistemas de liberação de fármacos direcionados e práticas clínicas devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas únicas (Prasathkumar; Sadhasivam, 2021).

Dentro desse grupo, os biomateriais poliméricos naturais têm recebido destaque por serem materiais que apresentam, boa renovabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade,

e devido a isso são amplamente utilizados em diversas áreas biomédicas, como engenharia de tecidos, reparo de traumas, liberação de fármacos e dispositivos médicos implantáveis (Zhang et al., 2024). Outra vantagem dos polímeros é a sua flexibilidade em termos de topologia, dimensões e composição química o que os torna substâncias adequadas para atuarem como um sistema de liberação de fármacos, potencializando a cicatrização de feridas (Oliveira et al., 2023).

No grupo dos polímeros naturais estão os ácidos nucleicos (DNA/RNA), polissacarídeos (glicosaminoglicanos, celulose, metilcelulose, amilose, quitina, amido, dextrana, agarose e alginato), proteínas (colágeno, seda, elastina, gelatina, queratina, titina, fibrina e mucina), lipídios e macromoléculas complexas, como os proteoglicanos (agrecan, versican, neurocan e lumican) (Joyce et al., 2021). Estes polímeros naturais são frequentemente extraídos de fontes orgânicas como plantas, algas, microrganismos ou animais (Satchanska; Davidova; Petrov, 2024). O que torna uma vantagem devido à sua semelhança com os componentes da matriz extracelular (MEC), evitando reações imunológicas crônicas e toxicidade, frequentemente observadas com polímeros sintéticos (Aravamudhan et al., 2014).

Figura 1. Representação dos biomateriais naturais utilizados como plataformas bioativas ao longo dos anos.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

## 2.2 Alginato em aplicações biomédicas

O alginato é um polissacarídeo natural encontrado em algas marrons e bactérias, sua composição se dá por meio de resíduos de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) dispostos linearmente em ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, ele é considerado um biomaterial por suas características biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo e de fácil disponibilidade (Paques et al., 2014). Em bactérias, a sua principal função refere-se à formação

de uma cápsula protetora, que auxilia na formação de biofilme e conseqüentemente facilita a adesão e a colonização (Hay et al., 2013). Nas algas, o alginato atua na parede celular promovendo flexibilidade e estrutura (Venkatesan et al., 2014).

Devido à sua alta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, condições de gelificação brandas e propriedades físico-químicas ajustáveis, os sistemas à base de alginato têm sido amplamente explorados em aplicações biomédicas, sobretudo na engenharia de tecidos, curativos, plataformas de liberação de fármacos e medicina regenerativa. Além de seu perfil de segurança favorável, o alginato exhibe uma capacidade única de reter água e manter um microambiente hidratado, o que é fundamental para a proliferação e migração celular, além de atuar na promoção do reparo tecidual com maior agilidade (Satchanska; Davidova; Petrov, 2024).

Em relação à sua estrutura, o desempenho biomédico do alginato é influenciado pela distribuição relativa e pela proporção de resíduos de ácido M e G ao longo da cadeia polimérica (Fernando et al., 2020). A modulação da razão M/G e da densidade de reticulação possibilita o controle preciso de propriedades-chave do material, incluindo resistência mecânica, porosidade, comportamento de intumescimento e taxa de degradação (Abkakhajouei et al., 2022). Alginatos ricos em G geralmente produzem géis mais rígidos e quebradiços, enquanto composições ricas em M produzem matrizes mais macias e elásticas. Essas características ajustáveis são particularmente relevantes em contextos biomédicos, pois influenciam a adesão celular, a migração e a difusão de nutrientes dentro da matriz (Ren et al., 2024; Zheng et al., 2023).

O alginato é um dos constituintes mais dominantes de estruturas dérmicas bioativas (Torres et al., 2019). No estudo de medicina regenerativa, o alginato de forma isolada tem sido utilizado em diversas formulações, como hidrogéis, estruturas, filmes, microesferas e fibras, porém apesar de toda sua biocompatibilidade, o alginato de forma isolada apresenta enorme desvantagens, ao formar um gel macio, o que limita sua resistência mecânica, tornando-o inadequado para aplicações que exigem sustentação de carga ou regeneração de tecidos moles sem reforço (Axpe; Oyen, 2016). Devido a esse fato pesquisas têm apostado no uso de forma sinérgica com outros biopolímeros que juntos favoreçam o processo de cicatrização e outras ações biológicas (Tomić et al., 2023).

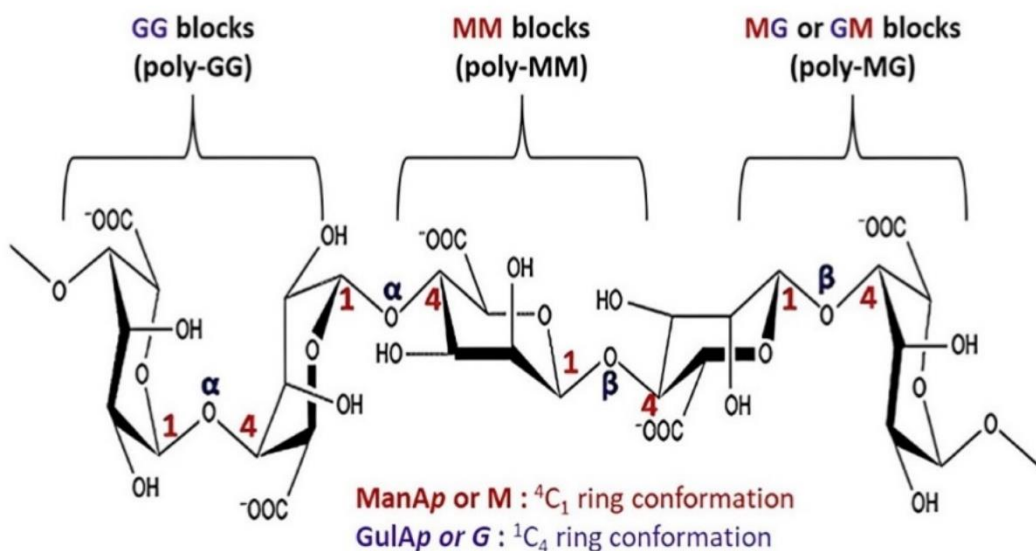
Atualmente, as pesquisas com alginato se concentram em diversos eixos e aplicabilidades. Os hidrogéis de alginato têm sido explorados como veículo, utilizado para melhorar a utilização de medicamentos, através de sistemas de liberação de fármacos, incluindo

aplicações em terapias anticâncer, nas quais sua capacidade de encapsulação, proteção e liberação controlada de moléculas bioativas contribui para o aumento da eficácia terapêutica e a redução de efeitos colaterais sistêmicos (Shanmugapriya; Kim; Kang, 2020). Sendo aproveitado para carrear nanomateriais como, nanotubos (Zolfagharian et al., 2023); nanopartículas (Liu et al., 2021) entre outros biomateriais que auxiliam numa lenta e controlada liberação farmacológica.

Na medicina regenerativa, membranas à base de alginato têm sido empregadas como curativos bioativos, incluindo sistemas com propriedades antimicrobianas e capacidade de liberação controlada de agentes terapêuticos, além de serem úteis no campo da engenharia de tecidos, como matriz tridimensional para suporte celular, com aplicações que abrangem desde a regeneração de tecidos moles até estratégias voltadas à reconstrução de tecidos mais complexos, como tecido ósseo e cartilaginoso (Portnov; Shulimzon; Zilberman, 2017; Rezvani Ghomi et al., 2019; Xue et al., 2022).

Esses avanços reforçam o papel do alginato não apenas como um biomaterial consolidado, mas como uma plataforma dinâmica em constante evolução, cuja versatilidade sustenta sua ampla investigação em contextos terapêuticos emergentes e consolidados.

Figura 2. Estrutura química do alginato.



Fonte: Adaptado de Mustafa et al. (2024).

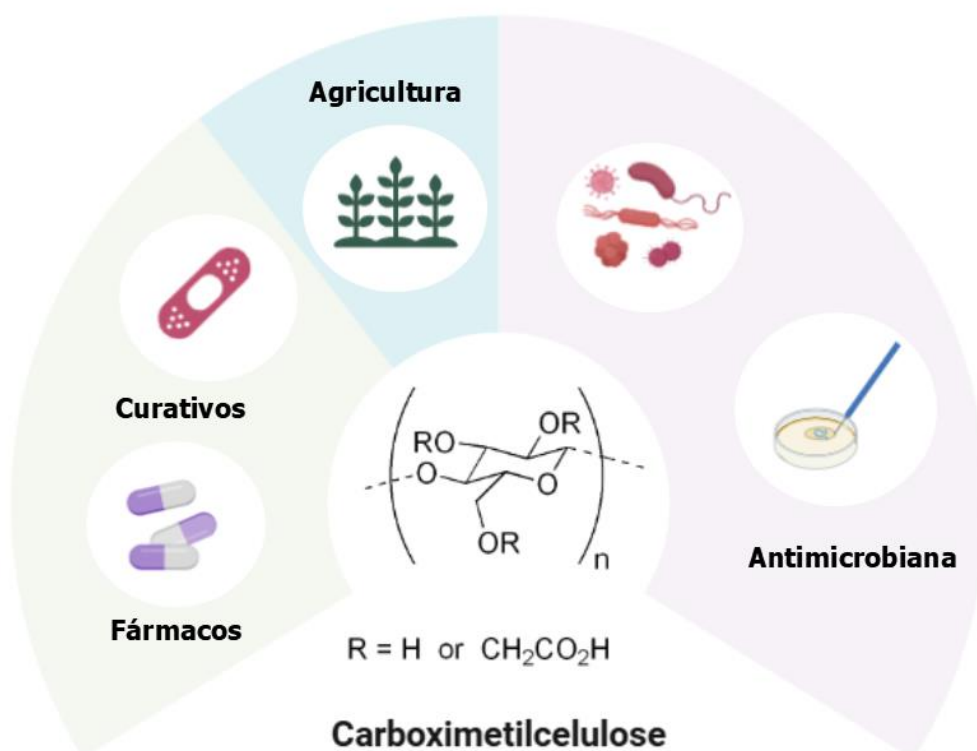
### 2.3 Carboximetilcelulose em aplicações biomédicas

Além do alginato outros biopolímeros têm sido frequentemente investigados como plataformas bioativas para aplicações biomédicas, como é o caso da carboximetilcelulose

(CMC). Considerado um dos polissacarídeos mais importantes, sua formação se dá por meio da modificação da celulose obtida pela substituição parcial dos grupos hidroxila da cadeia de glicopirranose por grupos carboximetil, principalmente nos carbonos C2, C3 e C6, no qual essa modificação confere carga negativa às cadeias poliméricas, aumentando sua hidrofiliabilidade, solubilidade em água e capacidade de intumescimento, além de favorecer a formação de redes estabilizadas por ligações de hidrogênio (Kanikireddy et al., 2020).

Assim como o alginato, a estrutura do CMC lhe confere propriedades importantes para diversas atividades biológicas, tais como, biocompatibilidade, hidrofiliabilidade, resistência mecânica, permeabilidade ao oxigênio, retenção de umidade, adesão tecidual, baixa toxicidade (Zhong et al., 2025). Essas características conferem ao CMC a atuação como matriz funcional em aplicações de engenharia de tecidos, aplicações de fármacos, regeneração tecidual, curativos, ação antimicrobiana (Yang et al., 2023) e até mesmo na agricultura (Akalin; Pulat, 2020).

Figura 3. Estrutura química da carboximetilcelulose sódica e suas aplicações biológicas.



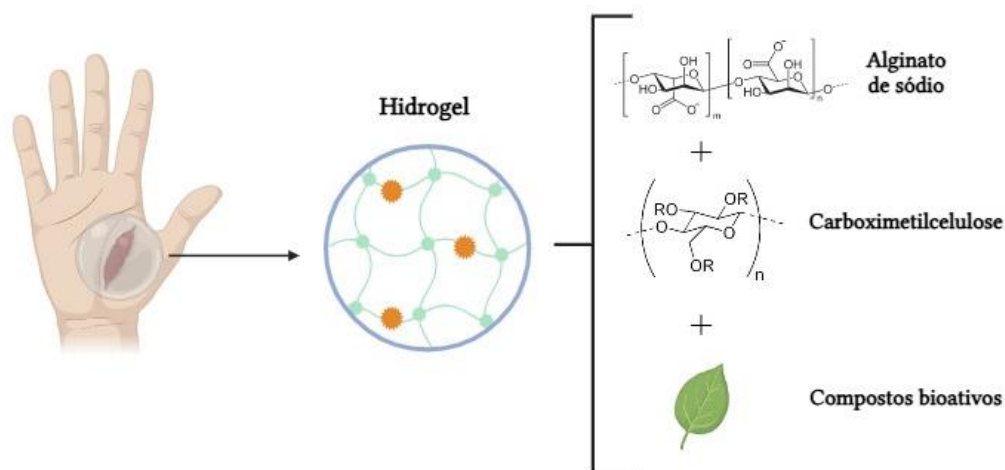
Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

## 2.4 Alginato e carboximetilcelulose combinados em aplicações biomédicas

A combinação do alginato e CMC têm se consolidado como uma estratégia eficiente para o desenvolvimento de matrizes poliméricas bioativas com propriedades emergentes superiores às observadas nos sistemas individuais. Esses dois biopolímeros se complementam através de suas características estruturais, resultando em redes poliméricas interpenetrantes capazes de integrar elevada capacidade de retenção hídrica, estabilidade estrutural em ambientes altamente hidratados e desempenho mecânico ajustável (Morozkina et al., 2022).

Além disso, as estruturas químicas, decorrentes da presença de grupos aniônicos ao longo das cadeias poliméricas favorece interações físicas com biomoléculas e agentes terapêuticos, permitindo a modulação do microambiente biológico e o controle funcional da liberação de ativos (Hosseini et al., 2024).

Figura 4. Representação gráfica de hidrogéis e compostos bioativos utilizados na cicatrização de lesões cutâneas.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

## 2.5 Angiogênese e limitações de terapias convencionais

O crescimento e a regressão insuficientes dos vasos sanguíneos contribuem para inúmeras doenças, desde infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral até neurodegeneração. Por outro lado, o crescimento descontrolado dos vasos promove a tumorigênese e doenças oculares, como a degeneração macular relacionada à idade. Historicamente, isso levou ao desenvolvimento de conceitos de terapia pró- e antiangiogênica, visando restaurar densidades vasculares adequadas (Schierling et al., 2009).

Na angiogênese, existe um limite para o quanto um tecido pode se expandir sem a geração de novos vasos sanguíneos para fornecer oxigênio e nutrientes (Folkman 1995). Os

tecidos circundantes precisam produzir fatores de crescimento pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) essencial para a formação e manutenção das redes vasculares, por meio de um processo frequentemente denominado de transição angiogênica (Hanahan; Folkman, 1996; Koch; Claesson-Welsh, 2012).

A notoriedade da angiogênese despertou então a esperança de que a manipulação desse processo pudesse oferecer oportunidades terapêuticas (Folkman, 1971). Apesar dos esforços para estimular terapeuticamente a angiogênese por meio de fatores pró-angiogênicos, a maioria dos ensaios clínicos não atingiu essas expectativas. Estratégias alternativas, baseadas em terapias celulares pró-angiogênicas ou no direcionamento de microRNAs, oferecem novas oportunidades, mas ainda estão em desenvolvimento (pré-)clínico (Doebele et al., 2010).

A importância fundamental da formação de vasos sanguíneos no desenvolvimento, na fisiologia normal e nas doenças fez da angiogênese um amplo campo de estudo; assim, a compreensão dos mecanismos da angiogênese, para a qual uma grande variedade de bioensaios disponíveis tem sido fundamental, está atualmente orientando o desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças (Nowak-Sliwinska et al., 2018; Bonanini et al., 2022; Dudley; Griffioen, 2023).

A isquemia por exemplo, é definida como a restrição do suprimento sanguíneo em um tecido, levando à escassez de oxigênio e à privação de nutrientes devido à incapacidade de remover resíduos metabólicos. É frequentemente causada por disfunção microvascular, como a associada ao diabetes, hipotensão e anemia falciforme, ou por suprimento sanguíneo insuficiente devido à vasoconstrição, malformações vasculares, trombose ou embolia, como as relacionadas à aterosclerose; também pode ser causada por trauma, intervenção farmacológica ou por causas iatrogênicas, como radioterapia ou cirurgia redutora (Kalogeris et al., 2012). A promoção terapêutica da angiogênese pela administração de VEGFA (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A) é, portanto, uma abordagem em casos de isquemia aguda (Han et al., 2023; Shimizu et al., 2023).

No caso da cicatrização de feridas, um processo altamente orquestrado que se resolve com a formação de cicatriz, a angiogênese prejudicada está na base da falha na cicatrização de feridas crônicas, como úlceras diabéticas. Mesmo tumores sólidos são frequentemente descritos como “feridas que nunca cicatrizam” devido a uma resposta inflamatória latente e não resolutive (Dvorak, 1986).

O papel da angiogênese é notavelmente diferente na cicatrização deficiente de feridas e em doenças como infarto do miocárdio, isquemia de membros ou acidente vascular cerebral, caracterizadas por perfusão tecidual inadequada e formação de tecidos isquêmicos (Fadini et al., 2019).

O reparo da zona hipóxica requer uma resposta pró-angiogênica robusta, definida por uma resposta inflamatória acentuada, na ativação de células imunes, biossíntese de citocinas pró-inflamatórias, liberação de fatores de crescimento pró-angiogênicos (VEGF, TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformador beta)), PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) ou níveis aumentados de MMPs (Metaloproteinases da Matriz) e NO (Óxido Nítrico), entre outros mediadores. No entanto, a angiogênese endógena pode ser limitada (por exemplo, devido a complicações comumente associadas, a idade avançada, diabetes ou aterosclerose), levando, assim, a uma remodelação ineficiente, cicatrização dos tecidos afetados e efeitos indesejáveis a longo prazo (Fadini et al., 2019).

A formação insuficiente de vasos sanguíneos é de grande interesse no que diz respeito às terapias pró-angiogênicas. Tecidos enxertados como osso, pele e tecido adiposo, frequentemente não prosperam devido à vascularização deficiente, isto é, a neovascularização (Barker; Markmann, 2013). Os estudos pioneiros liderados por Folkman (1971) e Isner et al. (1996) colocaram a angiogênese em destaque como alvo para terapias promissoras contra danos isquêmicos no nível cardiovascular.

Desde então, progressos significativos foram alcançados na busca por moléculas, isto é, fatores de crescimento como o VEGF que regulam a angiogênese. O estudo dos mecanismos moleculares da formação de vasos sanguíneos e a identificação de alvos terapêuticos estabeleceram a base das terapias antiangiogênicas e pró-angiogênicas atuais (Carmeliet; Jain, 2011; Liu et al., 2023).

Apesar dos grandes avanços farmacológicos alcançados como as terapias pró-angiogênicas celulares e do grande número de ensaios clínicos, ainda existe eficácia terapêutica questionável (resistência a medicamentos ou efeitos adversos e fora do alvo) dos tratamentos clinicamente aprovados (Liu, 2023).

Com isso, tornou-se evidente que as densidades vasculares não podem mais ser consideradas separadamente da função vascular ao se projetar terapias angiogênicas. E os conhecimentos sobre a angiogênese patológica, que orientarão futuras abordagens diagnósticas e terapêuticas, se concentrarão cada vez mais na qualidade funcional dos vasos e seus efeitos no metabolismo local, em vez de apenas na quantidade de vasos (Potente; Gerhardt; Carmeliet,

2011). As limitações das atuais terapias pró-angiogênicas incentivam a busca por novas abordagens na modulação e da formação de novos vasos sanguíneos, de acordo com cada contexto fisiológico (Ávila-Gálvez et al., 2025).

## **2.6 Alternativas baseadas em biomateriais para estímulo angiogênico**

A angiogênese induzida por biomateriais ocorre predominantemente por meio da formação de novos vasos a partir de estruturas vasculares preexistentes, sendo regulada pela migração, proliferação e diferenciação de células endoteliais (Xiao et al., 2015).

Uma das principais abordagens para estimular a angiogênese baseia-se na indução química promovida pela liberação controlada de moléculas bioativas e íons a partir de biomateriais. Fatores de crescimento angiogênicos, como VEGF, FGF, PDGF e TGF- $\beta$ , têm sido amplamente estudados devido à sua capacidade de regular o comportamento de células endoteliais e osteogênicas, promovendo a formação de redes vasculares funcionais (Mastrullo et al., 2020).

Os biomateriais são utilizados em diversas aplicações de engenharia de tecidos e administração de fármacos para promover a angiogênese e, conseqüentemente, influenciar a regeneração de tecidos e órgãos no corpo (Yamamoto; Raffi; Rabbany, 2014). São compostos naturais, sintéticos ou semissintéticos desenvolvidos especificamente para serem introduzidos em tecidos vivos sem provocar rejeição imunológica (Annese; Tamma; Ribatti, 2023).

Curiosamente, diversos estudos utilizam biomateriais para demonstrar o papel das células imunes na modulação da comunicação intercelular heterotípica (Spiller et al, 2015) e da vascularização na melhoria da regeneração que levou ao desenvolvimento de diversos biomateriais com elementos de design pró-angiogênicos e regenerativos combinados para a recuperação da função parenquimatosa específica do tecido. Foram desenvolvidos para vários sistemas teciduais, incluindo ilhotas pancreáticas, tecido neural e sistema musculoesquelético (Ngo; Harley, 2020).

Os biomateriais emergiram como uma estratégia fundamental na engenharia de tecido ósseo, modulando precisamente a diferenciação de células-tronco para alcançar funções osteogênicas e angiogênicas coordenadas. Estudos recentes destacaram a importância do microambiente ósseo na promoção da diferenciação de células progenitoras endoteliais em células endoteliais vasculares, enfatizando ainda mais a importância dos biomateriais na orquestração da angiogênese juntamente com a osteogênese (Mahapatra et al., 2022; Yang et al., 2023).

Os microambientes teciduais contêm sinais biofísicos, bioquímicos e metabólicos distintos que podem influenciar diretamente o comportamento celular ou indiretamente na sinalização de forma a direcionar uma ampla gama de resultados fenotípicos (Scadden, 2006; Lane; Williams; Watt, 2014).

O nicho vascular, que é o microambiente imediatamente circundante à vasculatura, tem sido implicado no suporte a vários processos biológicos, dentre eles, regeneração tecidual, manutenção de células-tronco e progressão do câncer. Esses conhecimentos evidenciam o nicho vascular nos processos regenerativos e a integração de componentes do nicho com plataformas de biomateriais (Bezenah; Kong; Putnam, 2018).

Tais tecnologias utilizam por exemplo, células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) que podem eventualmente permitir o desenvolvimento dessas plataformas a partir de células derivadas de pacientes e seriam particularmente valiosas como modelos de doenças (Chen et al., 2010; Ngo; Harley, 2020).

Considerados sistemas avançados de biomateriais, podem fornecer suporte estrutural e regulação biológica, com desenvolvimentos recentes incorporando cerâmicas bioativas, polímeros biodegradáveis e compósitos com fatores de crescimento (Xue et al., 2022; Mirkhalaf et al., 2023).

### **2.6.1 Polímeros sintéticos no estímulo angiogênico**

Os polímeros sintéticos são materiais formados por longas cadeias de moléculas que são criadas artificialmente através de processos químicos (Davoodi et al., 2024). Destes biomateriais, os inorgânicos não metálicos oferecem vantagens para a regeneração óssea. No entanto, seu uso clínico é desafiado pela fragilidade e vascularização limitada, o que exige compósitos para melhorar a resistência mecânica e a angiogênese. Neste sentido, as cerâmicas de fosfato de cálcio degradam-se lentamente, dificultando a remodelação, enquanto as cerâmicas de silicato e o MBG (grafeno modificado com metal) necessitam de dissolução controlada para prevenir a inflamação. Moléculas bioativas aprimoram esses materiais, combinando suporte estrutural com modulação biológica (Yang et al., 2023).

Como exemplo, uma proteína de fusão VEGF ligadora de colágeno que demonstrou melhor retenção em biomateriais de suporte à base de colágeno em comparação com VEGF isoladamente e mostrou promover angiogênese no coração isquêmico (Zhang et al., 2009).

Por outro lado, pesquisas com biomateriais do sistema de hidrogel têm a capacidade de funcionar como plataformas de liberação de fármacos devido à sua capacidade de serem

dopados com moléculas bioativas e protegidos da degradação rápida *in vivo*, promovendo assim a regeneração tecidual a longo prazo. A injeção de partículas de hidrogel carregadas com SLIT3 demonstrou promover a angiogênese do tipo H e melhorar a integração tendão-osso (Li et al., 2023).

Ainda observando estudos de biomateriais utilizados para o carregamento de fármacos, um filme multicamadas com propriedades osteogênicas e angiogênicas foi criado sobre um substrato de titânio puro através da montagem sequencial de quitosana enxertada com  $\beta$ -ciclodextrina e gelatina carregada com pitavastatina. O material não só promoveu a expressão de genes e proteínas relacionados à osteogênese em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), como também facilitou a expressão de genes e proteínas relacionados à angiogênese, incluindo VEGF, em células-tronco mesenquimais (MSCs) (Chen et al., 2022).

Dada a importância dos hidrogéis no domínio da engenharia de tecidos nos últimos anos. A classificação dos hidrogéis é determinada principalmente pelo tipo de biomaterial que os compõe (Li et al., 2025), sendo os biomateriais sintéticos compostos por ácido como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido hidroxiglicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL) e seus copolímeros; estes emergiram como componentes essenciais na área da engenharia de tecidos ósseos (Liu; Thomopoulos; Xia, 2012).

Trabalhos como os de Li et al. (2025) prepararam GelMA carregado com exossomos derivados de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo hipoplásico (hypo-ADSC-Exos) incorporando exossomos na estrutura porosa do hidrogel. A quantidade de formação óssea na região da fratura osteoporótica foi bem pronunciada. E as análises de angiografia e imunofluorescência indicaram regeneração substancial de vasos do tipo H na região da fratura, sugerindo que o encapsulamento de exossomos dentro do hidrogel aumentou sua funcionalidade pró-angiogênica do tipo H.

Outro tipo de biomaterial é a combinação de microesferas de PLGA encapsulando um fator angiogênico com outro andaime poroso de PLGA incorporando outro fator angiogênico permite a entrega sequencial de fatores angiogênicos, como VEGF e angiopoietina-I (Peirce; Price; Skalak, 2003), VEGF e PDGF-BB (Richardson et al., 2001) ou FGF-2 e PDGF-BB (Cao et al., 2003), para promover a formação de vasos mais maduros e estáveis do que a entrega simultânea dos fatores angiogênicos.

Há hidrogéis de PEG por reticulação com ligantes cliváveis, como peptídeos cliváveis por metaloproteinases da matriz, nos quais demonstraram a liberação de VEGF sob demanda celular e o subsequente crescimento celular no hidrogel de PEG (Zisch et al., 2003).

Além deste, um peptídeo mimético de VEGF de adesão celular de Arg-Gly-Asp e um peptídeo clivável por colagenase em hidrogéis de diacrilato de PEG usando um ligante de éster succinimidil mostraram a angiogênese promovida no hidrogel (Leslie-Barbick et al., 2011).

Estudos demonstraram ainda que um gradiente de concentração local de SDF-1 gerado por hidrogéis de PEG contendo um glicosaminoglicano sulfatado poderia aumentar o recrutamento de EPCs circulantes e a angiogênese subsequente *in vivo* (Prokoph et al., 2012).

A vascularização em biomateriais sintéticos, como o poli(etileno glicol) (PEG), tem sido uma área de foco, particularmente para estratégias de medicina regenerativa (Moon et al., 2010; Brown et al., 2020).

### **2.6.2 Polímeros naturais no estímulo angiogênico**

Além dos biomateriais sintéticos, uma estratégia atraente invoca compostos naturais como alternativa aos tratamentos farmacológicos atuais, graças ao seu potencial de eficácia e toxicidade reduzida. Os materiais de origem natural utilizados para vascularização incluem fibrina e colágeno. O colágeno é ubíquo em diversos microambientes teciduais e, portanto, é excelente para estrutura e composição da MEC. O colágeno promove a formação da rede endotelial em geral e também tem sido utilizado para desenvolver modelos de vascularização específicos de tecidos (Cruz et al., 2020, Crosby et al., 2020).

Certos biomateriais naturais estão sendo estudados para regeneração neural, representando uma terapia potencial para pacientes que sofreram um AVC (acidente vascular cerebral) ou para pacientes com doenças neurodegenerativas. A densa rede vascular associada ao tecido fisiológico motiva esforços que visam aprimorar os processos vasculogênicos para auxiliar na cicatrização (Garreta et al., 2024).

O impacto de hidrogéis de origem natural tem sido amplamente estudado em diferentes tipos de células-tronco, mas existem poucos relatos sobre seus efeitos em agregados e organoides. Nesse contexto, hidrogéis derivados de rim, juntamente com o uso de VEGF solúvel, demonstraram recentemente atuar como fonte primária de vascularização durante a derivação de organoides renais a partir de células-tronco pluripotentes humanas (hPSC). Resultados como este, comprovam a capacidade dos hidrogéis derivados de MEC renal de potencializar a habilidade das células progenitoras renais derivadas de hPSC de se auto-organizarem de forma robusta e originarem estruturas multicelulares complexas, incluindo um componente vascular (Garreta et al., 2024).

Estudos de Moshayedi et al. (2016) desenvolveram um hidrogel de HÁ (ácido salicílico) com sítios de ligação integrados para fibronectina (RGD) e laminina (YIGSR e IKVAV) e um agente de reticulação degradável por MMP, que pode ser injetado na cavidade do AVC em camundongos para fornecer células progenitoras neurais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS-NPCs).

Já em um estudo focado na regeneração muscular, géis de alginato incorporando VEGF e IGF1 foram injetados em camundongos com isquemia do membro posterior (Borselli et al., 2010). A administração de hidrogéis contendo ambos os fatores de crescimento levam a um aumento da massa muscular pós-lesão em comparação com camundongos que receberam um hidrogel sem VEGF, juntamente com aumento da vascularização e perfusão. Este sistema de biomaterial também suporta a regeneração da junção neuromuscular, e o aumento da força de contração muscular pós-tratamento confirma a funcionalidade do músculo regenerado com a administração combinada de VEGF e IGF1 (Ngo; Harley, 2020).

Pesquisas relacionados a biomateriais a partir de polímeros naturais ligados a ensaios *in vivo* como o de Yu et al. (2009) mostraram a injeção intramiocárdica *in vivo* de alginato iônico e compararam com cola de fibrina; perceberam que houve aumento da arteriogênese tanto no alginato quanto na cola de fibrina.

Outros estudos apresentam a adição de CS (quitosana) em géis macios como o Alg (alginato) aumentaram a eficácia terapêutica do composto devido à forte estabilidade mecânica da CS. Demonstrou-se que a CS melhora o enxerto e a sobrevivência celular, contribuindo para o reparo miocárdico. A injeção intramiocárdica precoce de Alg-CS preservou a espessura da cicatriz, atenuou a expansão do infarto, reduziu a fibrose cicatricial, aumentou a angiogênese e o recrutamento de reparo endógeno na zona do infarto (Patel et al., 2021).

Pesquisas de Bai et al. (2014) com um novo hidrogel de alginato oxidado e gelatina, reticulado por uma reação de base de Schiff, exibiram maior resistência mecânica, angiogênese e maior capacidade de recrutamento celular quando comparado ao alginato reticulado com cálcio.

A relevância da angiogênese para a recuperação tecidual também pode ser observada em contextos de cicatrização comprometida. As dificuldades associadas à cicatrização de feridas crônicas têm sido atribuídas, principalmente, à falta de angiogênese, reforçando o papel central da formação de novos vasos sanguíneos nos processos de reparo e regeneração tecidual (Pazyar et al., 2014).

Como exemplo, Rabbany e colaboradores (2010), utilizaram um adesivo de hidrogel de alginato para administrar SDF-1, demonstraram a aceleração da cicatrização e a redução da formação de cicatrizes em um modelo animal que mimetiza de perto a cicatrização de feridas em humanos.

Alguns modelos, isto é, ensaios laboratoriais são utilizados em combinação com os polímeros naturais para indução da angiogênese. O ensaio da membrana corioalantoide (MCA) do embrião de galinha representa um procedimento simples e econômico, no qual é muito utilizado em ensaios *in vivo* para o estudo da angiogênese pois possui uma rede capilar muito densa (Ribatti, 2008; Ribatti, 2010).

### **2.6.3 Ensaio da membrana corioalantoide como modelo para análises em polímeros naturais**

Diversos compostos têm sido relatados como estimuladores da angiogênese MCA. Esses compostos incluem fatores de crescimento, hormônios, moléculas naturais, gases, compostos organometálicos, moléculas pró-angiogênicas, antibióticos, anticorpos e pequenas moléculas sintéticas. O agente de teste é geralmente introduzido na forma de pequenos discos de filtro ou material polimerizado, como metilcelulose, alginato, esponja de gelatina e até mesmo polímero sintético biológico (Ribatti, 2008).

A grande vantagem é que a janela do ovo permite a inspeção visual do implante no local de teste (Leene et al., 1973). É uma ferramenta valiosa para estudar o crescimento e a distribuição de vasos em estruturas compostas por biomateriais apropriados e populações de células-tronco utilizadas em abordagens regenerativas baseadas em células (Woloszyk et al., 2016).

A membrana corioalantoide tem sido usada com sucesso como um ensaio de triagem para a resposta biológica a biomateriais e como uma alternativa aos modelos animais tradicionais, tornando-se parte integrante do processo de teste para o desenvolvimento de potenciais biomateriais (Annese; Tamma; Ribatti, 2023).

Embora diferentes abordagens tenham sido investigadas ao longo dos anos para promover a neovascularização em enxertos de engenharia tecidual, o desenvolvimento de biomateriais capazes de guiar de forma integrada a regeneração tecidual e a formação de uma rede vascular complexa ainda representa um desafio significativo (Ellermann et al., 2023). Tendo em vista esses critérios, pesquisas como essas evidenciam o interesse e essencialidade em desenvolver biomateriais inteligentes que possam modular o microambiente, aprimorando

a vascularização, a formação óssea e integração tecidual (Santos et al., 2009), assim como a possibilidade da inserção de novos fármacos.

## 2.6 Classificação estrutural das lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, capazes de reconhecer e ligar-se reversivelmente a moléculas de carboidratos específicas, tendo a capacidade de modular distintas respostas celulares (Lam; Ng, 2010). Estão extensivamente distribuídas no reino vegetal; constituindo principalmente as famílias Leguminosae, Algae, Euphorbiaceae, Gramineae, dentre outras. A família Leguminosae tem o maior grupo de lectinas bem caracterizadas, apresentam uma variedade de especificidade de carboidratos (Ingale; Hivrale, 2013), elas podem ser encontradas em tecidos vegetais, como folhas (Ratanapo et al., 2001), raízes (Peumans et al., 1997; Van Damme et al., 1997), tubérculos (Suseelan et al., 2002), látex, néctar, flores (Seshagirirao; Prasad, 1995) e frutos (Sampietro et al., 2001).

Além disso, demonstram ser importantes instrumentos em diversas áreas da ciência, com ênfase, em processos médicos, químicos e biológicos, distribuídas na natureza, desde microorganismos, plantas e animais (Ximenes, 2009).

Análises de genoma e transcriptoma de plantas forneceram evidências para a ocorrência de muitas proteínas contendo um ou mais domínios de lectina incorporados em uma arquitetura de múltiplos domínios mais ou menos complexa (Van Damme et al., 2008). Complexidade e heterogeneidade, é preferível considerar a classe de lectinas vegetais em termos dos domínios de ligação a carboidratos presentes nessas proteínas (Vandenborre; Smaghe; Van Damme, 2011).

De acordo com Van Damme et al. (1998), as lectinas extraídas a partir de vegetais são classificadas considerando suas habilidades de reconhecimento e especificidade de ligação de maneira reversível aos carboidratos e seus aspectos estruturais, estando organizadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são proteínas que apresentam em sua estrutura apenas um domínio ligante de carboidrato, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados, visto que, são monovalentes; por exemplo, tem-se a *Hevea brasiliensis* (Van Parijs et al., 1991).

As hololectinas por sua vez, possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos idênticos e semelhantes. São divalentes e multivalentes por natureza, elas causam aglutinação de células e precipitação de glicoconjugados. A maioria das lectinas compreende esta classe, entre elas, as espécies da subtribo Diocleinae (Cavada et al., 2001).

As superlectinas são uma classe distinta de hololectinas e também são consideradas um grupo especial de quimerolectinas; elas possuem dois domínios de ligação a carboidratos não idênticos que reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. Por exemplo, a lectina do bulbo de tulipa TxLCI, que contém dois domínios de ligação a carboidratos distintos, que se ligam especificamente a resíduos de açúcar de manose e GalNAc (*N*-acetilgalactosamina) (Van Damme et al., 1997).

Finalizando, as quimerolectinas não contêm domínios de carboidratos propriamente ditos, mas são proteínas 'quiméricas' que possuem um domínio de ligação a carboidratos marcado com outro domínio que possui atividade enzimática. O domínio enzimático opera independentemente do domínio de ligação a carboidratos. De acordo com o número de domínios ligantes a carboidratos, esta classe de lectinas pode ser considerada como merolecinas ou hololectinas. Como exemplo, se tem as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) do tipo 2 que são multivalentes, aglutinam células facilmente enquanto as quitinases vegetais da classe I, por serem monovalentes, não possuem essa atividade (Barbieri; Battelli; Estribo, 1993; Collinge et al., 1993; Peumans; Van Damme, 1998).

### **2.6.1 Lectina de *Canavalia ensiformes* – ConA**

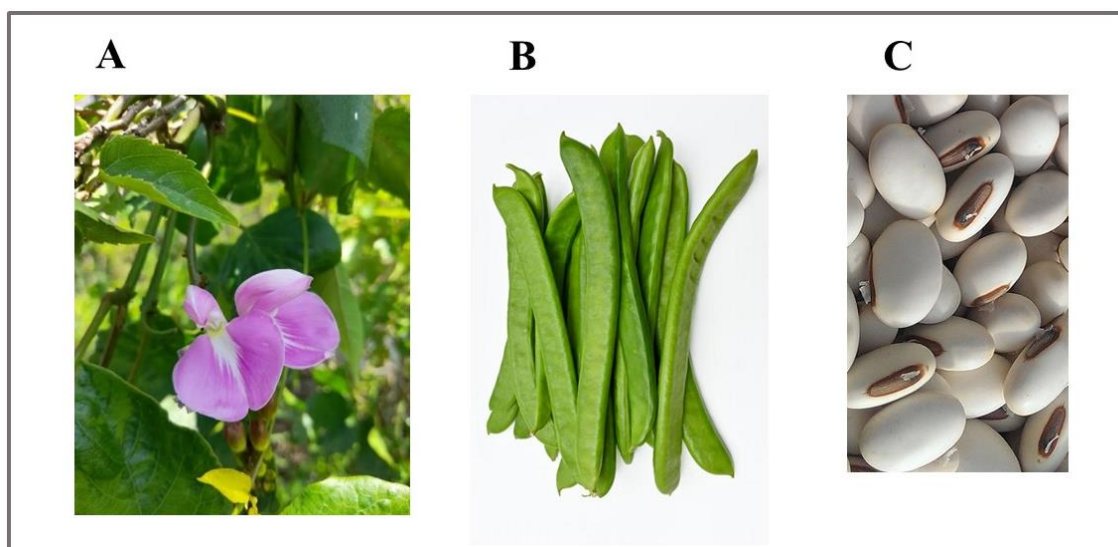
A lectina ConA foi decifrada como uma glicoproteína de defesa, isolada das sementes do feijão-de-porco (Huldani et al., 2022; Wang et al., 1975), foi a primeira purificação de lectina realizada em 1919 por James Sumner, a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*. Sumner isolou uma proteína que denominou de Concanavalina A (ConA) (Sumner 1919), deste modo obteve-se a primeira hemaglutinina pura, terminologia que ao logo dos anos tornou-se “lectina”, termo generalizado para todas aquelas proteínas que possuíssem a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas (Sharon; Lis, 1972), ocorrendo inibição desta atividade por carboidratos (Rüdiger, 1998).

A ConA tem alta especificidade por moléculas como  $\alpha$ -D-Man,  $\alpha$ -D-Glu e  $\beta$ -D-Fru (Badr et al., 2014), sua capacidade de ligação aos glicanos determina sua mitogenicidade e funções biológicas. Desde sua descoberta despertou interesse mitogênico para linfócitos (Powell; Leon, 1970); atualmente é amplamente investigada e estudada para terapias e inovações biomédicas, como discriminar células normais e cancerosas, induzir angiogênese, autofagia e apoptose, e ativar linfócitos (Yu; Shu; Li, 2020; Li et al., 2022).

Em termos de propriedades físico-químicas, a ConA é uma lectina estável, capaz de suportar temperaturas até 60 °C sem perda de função biológica e uma ampla faixa de pH (5–8) (Clark, 2012). O pH do meio é o principal fator que determina o estado de oligomerização

da lectina, sendo que, em pH 5,8–7, a ConA apresenta sua forma tetravalente nativa biológica. Em contraste, o pH < 5,8 e > 7 tem valências mais baixas e mais altas, respectivamente (Cavada et al., 2019).

Figura 5. Imagem da planta de *Canavalia ensiformes*, demonstrando suas respectivas (A) inflorescência, (B) vargens e (C) sementes.



Fonte: EarthOne.com

### 2.6.2 Concanavalina A – Breve histórico estrutural

Os primeiros avanços no entendimento da estrutura, obtidos com meios tecnológicos limitados, ditaram o curso de todo progresso posterior. Em 1919, Sumner purificou a ConA por meio da cristalização de globulinas (Sumner, 2019), e desde então, muitos estudos envolvendo a ConA foram publicados ao longo das décadas, indicando que essa proteína foi meticulosamente investigada e caracterizada (Cavada, 2018). A resolução estrutural da ConA demonstrou o poder da cristalografia de raios X na compreensão da base estrutural da ligação de carboidratos.

Anos depois, estudos realizados por Nakamura e Suzuno obtiveram em 1965 resultados similares da sua cristalização, a partir daí análises da estrutura vem sendo investigado como difração de raios X (Greer; Kaufman; Kalb, 1970), difração de ConA desmetalizada (Jack; Weinzierl; Kalb, 1971) e cristalização/difração com derivados de metais pesados (Hardman; Ainsworth, 1972; Reeke; Becker; Edelman, 1975).

Em 1974, a sequência completa da ConA foi determinada por análise de degradação de Edman de fragmentos de brometo de cianogênio digeridos com enzimas proteolíticas. O sequenciamento foi realizado e confirmado simultaneamente por comparação com dados

cristalográficos de difração de raios X, apresentando em sua estrutura uma glicoproteína monomérica de 237 resíduos ( $M_w = 27$  kDa) (Clark, 2012); neste estudo foi analisado também o sítio exato de clivagem da cadeia polipeptídica em seu processo pós-translacional (Cunningham; Wang; Edelman, 1975; Wang et al., 1975), tornando a primeira lectina a ter sua sequência completa e estrutura tridimensional determinadas (Cavada et al., 2019).

Hardman e Ainsworth no ano de 1972, foram os primeiros a resolver a estrutura tridimensional da ConA, primeira lectina de leguminosa a ter sua estrutura obtida (PDB id: 3CNA) e somente em 1975, Reeke, Becker e Edelman relatou a estrutura quaternária da ConA com coordenadas da cadeia principal do polipeptídeo, considerando a estereoquímica dos resíduos de aminoácidos na formação de ligações de hidrogênio e outras interações não covalentes (Cavada et al., 2019).

Ainda no ano de 1975, Becker e colaboradores observaram em uma resolução de 20 Å, que a estrutura cristalina da ConA interagiu com sacarídeos e metais. Obtendo uma estrutura secundária composta por cadeias  $\beta$ -sanduíche que necessitam de íons metálicos como  $Ca^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  para seu dobramento (Clark 2012).

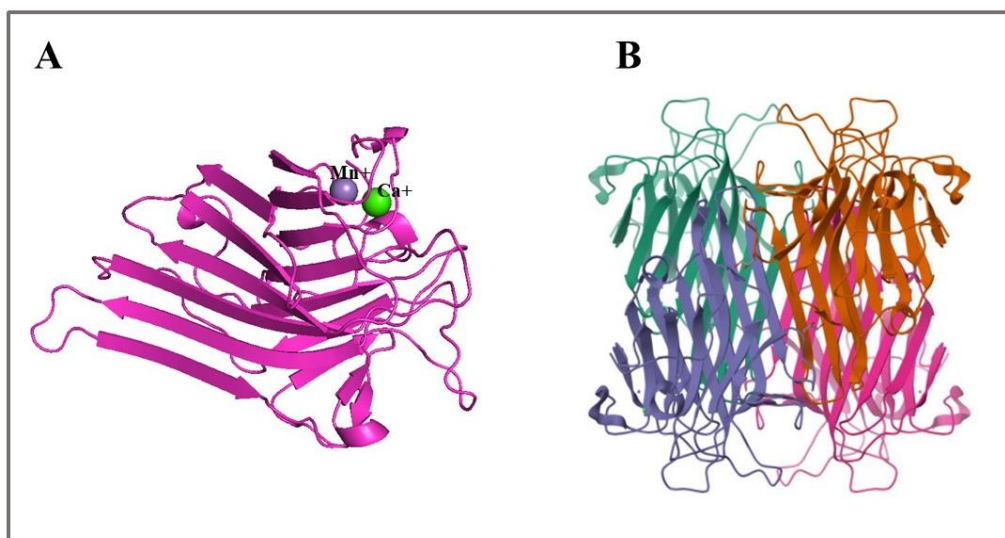
No ano seguinte, 1976, propuseram que o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC), uma estrutura composta por quatro alças, estaria próximo do local de ligação do metal; esses íons são importantes para a estabilização do DRC, permitindo assim a ligação da lectina aos carboidratos (Loris et al., 1998; Osterne et al., 2017), com alta especificidade para manósídeos simples, glicose,  $\alpha$ -metil-manosídeo e seus derivados. Enquanto os sacarídeos marcados com átomos pesados se ligavam à cavidade hidrofóbica (Becker et al., 1976).

O reconhecimento específico da lectina ocorre por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os resíduos do DRC e o carboidrato, no sítio primário envolvendo os resíduos Asp14, Leu99, Tyr100, Gly98, Ala207, Asp208 e Arg228 (Naismith et al., 1994). E nos dois outros sítios secundários estão presentes na estrutura da proteína: o sítio de ligação a metais e um sítio hidrofóbico adicional.

O ensaio de cristalização de Hardman em uma resolução de 6 Å, do complexo ConA com  $\alpha$ -metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo, confirmou a distância DRC de 35 Å à cavidade hidrofóbica e 10–14 Å ao sítio de ligação ao metal (Hardman; Ainsworth, 1972), no qual apresenta um íon de manganês é coordenado por Glu8, Asp10, Asp19, His24 e duas moléculas de água, enquanto um íon de cálcio é coordenado por Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 e duas outras moléculas de água (Parkin; Rupp; Esperança, 1996).

A presença dos íons na lectina é necessária para manter a conformação “cis” da ligação Ala207-Asp208, que modula o arranjo do sítio de ligação de carboidratos de modo que a falta de metais resulta na perda da capacidade de reconhecimento da lectina (Loris, 2002).

Figura 6. Estrutura tridimensional da lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA). (A) Representação da estrutura monomérica (PDB ID: 1JBC) com os íons cálcio (verde) e manganês (roxo). (B) Representação tetramérica (PDB ID: 9IJA) sem ligantes.



Fonte: Autor. Créditos: PyMOL e PDB.

### 2.6.3 Concanavalina A como moduladora da angiogênese

Muitos estudos têm buscado explorar os potenciais efeitos pró-angiogênicos de plantas medicinais e seus princípios ativos (Li et al., 2022). As CEs (células endoteliais) têm um imenso potencial na medicina regenerativa, particularmente em estratégias terapêuticas celulares que visam aprimorar construções de engenharia tecidual ou rejuvenescer tecidos isquêmicos por meio da neovascularização (Chen et al., 2019).

Estudos com ConA na proliferação celular e na atividade angiogênica em CEs veem sendo relatados. As CEs desempenham um papel vital na homeostase vascular na superfície interna dos vasos sanguíneos e linfáticos, além da via de sinalização (Deanfield et al., 2007).

Descobertas sobre o potencial da ConA abrem novas perspectivas, como um agente antineoplásico que pode gerar diferentes respostas em diferentes células, independentemente de modular ou não as vias de sinalização (Li et al., 2022).

Também já foi comprovado o efeito pró-angiogênico da ConA em camundongos com isquemia, onde essa lectina promoveu a fixação do membro isquêmico. O tratamento dos camundongos com isquemia de membro posterior por injeção local de ConA melhorou

significativamente a função e o fluxo sanguíneo do membro isquêmico (Li et al., 2022). Sendo uma limitação das terapias angiogênicas convencionais, é importante apresentar novas opções terapêuticas que envolvem a introdução de um agente capaz de promover o crescimento de novos vasos sanguíneos no tecido isquêmico (Bian et al., 2019).

Estudos da ConA como um agente antiaterosclerótico para reparar o miocárdio no infarto agudo do miocárdio, mostraram promover significativamente a proliferação celular, o ciclo celular e a atividade angiogênica em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) e em células endoteliais Ea.Hy926, por meio de pAkt, pERK1/2 e ciclina D1 (Li et al., 2022).

Curiosamente, a ConA é bem documentada como indutora de MT1-MMP, estas são indutoras e participantes importantes da angiogênese, sendo essencial para a migração e proliferação de células endoteliais durante a formação de vasos, de forma semelhante ao envolvimento de TLR (receptores do tipo Toll) (Arroyo et al., 2007; Strongin, 2010).

Estudos de Zgheib; Lamy; Annabi, (2013) reforçou a conhecida interação entre TLR e câncer (Goutagny et al., 2013), angiogênese (Grote; Schütt; Schieffer, 2011) e inflamação com o uso da lectina ConA, sendo um potente agonista de TLR-2 e TLR-6, na ativação de CTMs.

Huldani et al. (2022) também demonstrou a estimulação da angiogênese pela ConA; revelando que a administração de ConA induz notavelmente a proliferação de células endoteliais humanas e a angiogênese por meio de um eixo Akt/ERK/ciclina D1 e aumenta a secreção de fatores pró-angiogênicos, como VEGFa, PDGFaa e bFGF.

A importância fundamental da formação de vasos sanguíneos no desenvolvimento, na fisiologia normal e nas doenças fez da angiogênese um amplo campo de estudo; assim, a compreensão dos mecanismos da angiogênese, para a qual uma grande variedade de bioensaios disponíveis tem sido fundamental, está atualmente orientando o desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças (Nowak-Sliwinska et al., 2018; Bonanini et al., 2022; Dudley; Griffioen, 2023) e a ConA é uma molécula com alto potencial para o desenvolvimentos destes estudos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Produzir e investigar biopolímeros de alginato e carboximetilcelulose incorporados com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) para promover a ativação das vias de angiogênese e induzir revascularização como proposta terapêutica.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ◆ Produzir e caracterizar filmes de alginato e CMC incorporados com ConA;
- ◆ Investigar as características físico-químicas a fim de verificar a incorporação de lectina/filme, por meio de análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- ◆ Analisar a topografia da superfície, a forma e a estrutura dos filmes com a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ◆ Investigar o perfil de rugosidades presente nos filmes de alginato e CMC incorporados com ConA;
- ◆ Analisar a atividade hemaglutinante e o título da atividade hemaglutinante nos filmes de alginato e CMC contendo ConA;
- ◆ Investigar a atividade angiogênica por meio do ensaio da membrana corioalantoide do embrião de galinha nos filmes com a ConA;
- ◆ Analisar a imuno-histoquímica na expressão dos fatores (TGF- $\beta$  e VEGF) de indução da angiogênese.

#### 4 CAPÍTULO II – ARTIGO PUBLICADO

Este capítulo refere-se ao artigo intitulado: **"Development of Alginate/Carboxymethylcellulose Films Incorporated with *Canavalia ensiformis* Lectin (ConA) with Angiogenic Properties."**

Publicado na revista ACS Omega.

Qualis A2, Fator de Impacto: 4.3. Em 2025, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c05146>.

*O conteúdo foi mantido fiel ao texto original, de acordo com as diretrizes editoriais da revista. A formatação foi adaptada apenas em relação à padronização do número de figuras e tabelas, para atender aos padrões da ABNT aplicáveis a trabalhos acadêmicos.*

ACS Omega > Vol 10/Issue 45 > Article

Open Access

ARTICLE | November 3, 2025

**Development of Alginate/Carboxymethylcellulose Films Incorporated with *Canavalia ensiformis* Lectin (ConA) with Angiogenic Properties**

Maria Helena C. Santos, Ana Lúcia E. Santos, Israel J. M. Santos, Renato R. Roma, Abel V. M. Bisneto, Clever G. Cardoso, Bruno A. M. Rocha, Lee Chen-Chen, Aryane Tofanello, Wanius Garcia, Luis C. N. Silva, Ariane M. S. Santos, Edson C. Silva-Filho, and Claudener S. Teixeira\*

Cite Share Jump to Collapse

**Development of Alginate/carboxymethylcellulose films incorporated with *Canavalia ensiformis* lectin (ConA) with angiogenic properties**

Maria Helena C. Santos <sup>a</sup>, Ana Lúcia E. Santos <sup>b</sup>, Israel J.M. Santos <sup>c</sup>, Renato R. Roma <sup>a</sup>, Abel V.M. Bisneto <sup>d</sup>, Clever G. Cardoso <sup>d</sup>, Bruno A.M. Rocha <sup>a</sup>, Lee Chen-Chen <sup>d</sup>, Aryane Tofanello <sup>e</sup>, Wanius Garcia<sup>e</sup>, Luís C.N. Silva <sup>f</sup>, Ariane M. S. Santos<sup>g</sup>, Edson C. Silva-Filho <sup>g</sup>, Claudener S. Teixeira <sup>a,b\*</sup>.

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60451-970, CE, Brazil.

<sup>b</sup> Center for Agricultural Sciences and Biodiversity, Federal University of Cariri, Crato, 63130-025, CE, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Physical and Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato, 63105-000, CE, Brazil.

<sup>d</sup> Department of General Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, 74001-970, GO, Brazil.

<sup>e</sup> Center for Natural and Human Sciences, Federal University of ABC, 09210-580, SP, Brazil.

<sup>f</sup> Laboratory of Microbial Pathogenesis, CEUMA University, São Luís 65045-380, Brazil.

<sup>g</sup> Interdisciplinary Laboratory of Advanced Materials, Federal University of PiauÍ, PiauÍ, 64049-550, Brazil.

\*Correspondence to: Claudener Souza Teixeira, Universidade Federal do Cariri - E-mail: claudener.teixeira@ufca.edu.br

### Abstract

The development of new materials for wound care is a critical area, focused on creating dressings with improved properties, such as high absorption, flexibility, and low cost. In this context, natural polymers such as alginate and carboxymethyl cellulose (CMC) emerge as promising choices, given their biodegradability and their ability to promote an ideal healing environment. Concomitantly, lectins with angiogenic potential have been extensively investigated for their ability to modulate cellular responses and induce the formation of new blood vessels. This research aims to incorporate the lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) into alginate and carboxymethylcellulose (CMC) films to promote blood vessel growth and induce revascularization as a therapeutic approach. Film characterization and physicochemical tests showed efficient lectin/film incorporation, as observed through differential scanning calorimetry (DSC) analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). DSC analysis showed that alginate/CMC films with ConA tend to retain less water, volatilizing more easily, with a temperature difference of 94 and 81 °C to 69 and 77 °C films containing ConA. In addition to the significantly prolonged retention capacity of ConA in the film, FTIR data suggest that ConA is anchored in the alginate matrix due to the cross-linked nature of the film chain, with minimal chemical interactions (or chemical bonds). Analysis of hemagglutinating activity and immunohistochemical assays showed an increase in the expression of the angiogenic factors TGF- $\beta$  and VEGF. These results indicate that the biopolymers used are an effective alternative for wound treatment, pointing to future research into the development of therapeutic biofilms.

**Keywords:** Lectin; Immunohistochemistry; Vascularization.

## 4.1 Introduction

Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels from the endothelial cells (ECs) of pre-existing veins, arteries, and capillaries. It plays an essential role in embryogenesis and during life through physiological tissue development and repair processes.<sup>1</sup>

Endogenous chemical signals, local or systemic, coordinate the functions of endothelial cells and smooth muscle cells to repair damaged blood vessels,<sup>2</sup> which is a potentially beneficial approach in conditions where the promotion of new vessels can improve the perfusion of compromised tissues.<sup>3</sup> At the cellular level, degradation of the extracellular matrix increases the concentration of various growth factors, stimulating the migration and proliferation of endothelial cells. The formation of the vascular network consists of multiple coordinated, sequential, and interdependent steps mediated by various angiogenic factors, including growth factors, chemokines, angiogenic enzymes, endothelial-specific receptors, and adhesion molecules.<sup>4</sup> In the process, the transforming growth factor  $\beta$  family (TGF- $\beta$ , including TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, and TGF- $\beta$  3), cytokines, and VEGF family play crucial roles.<sup>5</sup>

Hydrogel films are an important class of materials used in various biomedical, pharmaceutical, and environmental applications.<sup>6,7</sup> Some hydrogels are combined with alginate and sodium carboxymethyl cellulose (CMC) due to their biocompatibility, biodegradability, low cost, and ease of production.<sup>8</sup> Because they contain a high percentage of water, hydrogels act by softening and removing devitalized tissue through debridement tissue through autolytic debridement. The water keeps the environment moist, and carboxymethylcellulose facilitates cellular rehydration and debridement. In addition, hydrogel films can serve as vehicles for bioactive molecules, including lectins.<sup>9,10</sup>

Concanavalin A (ConA) is one of the most well-characterized lectins, both in terms of its three-dimensional structure and its biological applications, which are based on its recognition and interaction with glycans present on the surface of various cells.<sup>11</sup> Among its key biological applications are the modulation of antibiotic activity in resistant bacteria,<sup>12</sup> neuroprotection,<sup>13</sup> leishmanicidal<sup>14</sup> and fungicidal activity,<sup>15</sup> among others.

Furthermore, studies such as that by Macedo et al.<sup>16</sup>, which used alginate and glycerol films conjugated with ConA and gentamicin, have shown promise for the treatment of skin lesions. These works demonstrated effective antimicrobial activity and encouraged subsequent *in vivo* investigations into healing properties.

ConA-like lectins, such as *Dioclea violacea* lectin (DVL) and *Vatairea macrocarpa* lectin (VML), have attracted increasing interest due to their remarkable angiogenic effect.<sup>17</sup> These

proteins, abundantly present in plants, have been shown to positively influence the formation of new blood vessels in various contexts.<sup>18,19</sup> The interaction between lectins and endothelial cells has been associated with the modulation of growth factors and cytokines, thus promoting angiogenesis and contributing to tissue regenerative processes.<sup>20</sup> However, none of these studies has evaluated the controlled release of these lectins during angiogenesis. This represents a new strategy that could lead to the development of a new class of materials with applications in wound healing.

As a whole, the research highlights the feasibility of integrating the ConA lectin with a film composed of alginate and carboxymethylcellulose (CMC), inducing angiogenesis pathways and promoting vascularization, which is essential in the advancement of therapeutic approaches and innovative drugs.

## **4.2 Methods**

### **4.2.1 Chemicals**

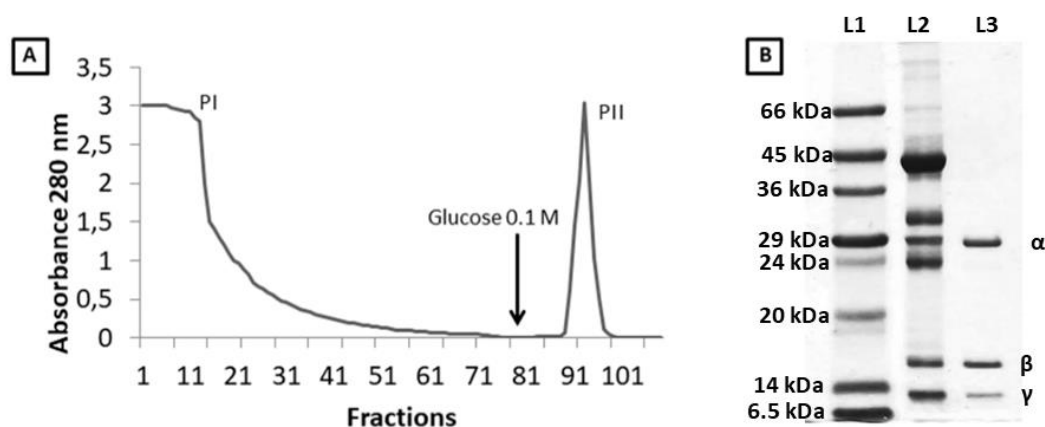
The reagents used in the tests are of analytical quality. For lectin purification, reagents from Sigma-Aldrich were used. For the production of films, sodium alginate (Cat No. W201502), carboxymethylcellulose (CMC) (Cat No. 21904) and calcium chloride (Cat No. P.10.0294.021.00.27) were from Dinâmica. Tris-HCl (Cat No. 10812846001) was obtained from Sigma-Aldrich. NaCl was purchased from Química Moderna (Brazil) (Cat No. QMA00001145700500). For angiogenic assessment assays, all reagents were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise specified. Dersani healing oil was purchased from Laboratório Doudt Oliveira Ltda. The staining solutions (hematoxylin and eosin) were purchased from LaborClin Ltda. All chemicals and reagents used in this study were of the highest purity and analytical grade.

### **4.2.2 Purification, production, and characterization of films**

#### *4.2.2.1 Purification of *Canavalia ensiformis* seeds – ConA*

*C. ensiformis* seeds were collected from plants located in Crato, Ceara, Brazil, the seed collection was registered in SISGEN (Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management System, ID: AF8E1DD). The seeds of *C. ensiformis* were ground to obtain a fine powder using an electric coffee mill, the soluble proteins were extracted at 25 °C by continuous stirring with 50 mL of 0.15 mol/L NaCl in 5 g of powder for 4 h, followed by centrifugation at 10,000g 4 °C for 20 min. Protein purification was carried out using the affinity chromatography

in a Sephadex-G50 column (Sigma, Saint Louis, USA) ( $2 \times 20$  cm) and eluted with 0.1 mol/L glucose. The fraction containing lectin from *C. ensiformis* (ConA) was then lyophilized and its homogeneity assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Supporting Information Figure S1), following the method described by Laemmli.<sup>21</sup>



Supplemental Figure 1. ConA purification by affinity chromatography. (A) Chromatogram of *C. ensiformis* crude extract on Sephadex G-50 column. (B) SDS-PAGE of purified ConA. (L1): Molecular weight markers (66–6.5 kDa); (L2): Crude extract of *C. ensiformis*; (L3): Purified ConA.

#### 4.2.2.2 Formulation of a cross-linked Alginate + film carboxymethylcellulose incorporated with the ConA lectin

The preparation and consecutive production of films based on alginate and carboxymethylcellulose (CMC) was achieved with two stages of cross-linking with calcium ions using the casting method. Initially, solutions were prepared with medium-viscosity alginate at 1% m/v and CMC at 1% m/v in distilled water. The biopolymers were solubilized in a magnetic stirrer at 750 rpm for 1 h at 25 °C. After achieving homogeneity, precross-linking began by slowly dripping a 1% m/v  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  solution with a Pasteur pipet, maintaining stirring. A proportion of 7.5 mL of cross-linking solution was used for each gram of alginate present in the solution. Once the homogenization process was complete, the solutions were transferred to polystyrene Petri dishes ( $6 \text{ cm} \times 6 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ ) in aliquots of 4.055 g (equivalent to 4.000  $\mu\text{L}$ ), and these were placed in BOD at a temperature of 40 °C and controlled ventilation for 20 h. After complete drying, each membrane was immersed in 10 mL of an aqueous solution of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  at 2.5% or 5.0% (m/v) for 15 min and subsequently washed in 10 mL of distilled

water. The films were then placed on polystyrene plates placed again at BOD at room temperature for 48 h for final drying.

#### 4.2.2.3 Group arrangement

For the characterization tests, the films were divided into six groups, three in 2.5% CaCl<sub>2</sub> cross-linking and three in 5.0%, these conditions were selected based on prior optimization. The arrangement of the groups is shown in following table (Table 1):

Table 1. Experimental Groups of Alginate/CMC Films with Different CaCl<sub>2</sub> Cross-Linking and ConA Treatments

Group	Cros-linking (CaCl <sub>2</sub> )	Treatment
1	2.5 %	Control (NaCl 150mM)
2	2.5 %	ConA 50 µg/mL
3	2.5 %	ConA 200 µg/mL
4	5.0 %	Control (NaCl 150mM)
5	5.0 %	ConA 50 µg/mL
6	5.0 %	ConA 200 µg/mL

#### 4.2.2.4 Visual appearance

The evaluation of the visual appearance of the films was recorded by digital photography using images captured with a digital camera (Nikon Coolpix L810 16.1 megapixels), which considered the homogeneity, continuity and cohesion of the film.

#### 4.2.2.5 Thickness of films

The thickness of the films was measured on a digital micrometer in 10 random positions. Films with any visible defect were discarded, and then the arithmetic mean of these values was taken.

#### 4.2.2.6 Swelling

For this analysis, film samples measuring 6 cm × 1 cm were previously weighed and then exposed to 10 mL of distilled water for 24 h in a B.O.D incubator at 25 °C. After immersion,

the samples were removed from contact with the fluid, excess moisture was blotted with filter paper if present, and finally reweighed. The degree of swelling (DS) was calculated based on the initial total mass of the sample according to eq 1, where  $M_u$  represents the mass of the wet sample and  $M_i$  is the initial mass of the sample.

$$DS = \frac{M_u}{M_i}$$

This equation provides a quantitative measure of the swelling extent experienced by the film samples during the experimental procedure.

#### 4.2.2.7 Mass loss

The percentage of mass loss was determined by immersing them in 10 mL of distilled water for 24 h. After the exposure period, the samples were dried in BOD at 37 °C until they reached a constant mass. The mass loss (ML) was determined by the relationship between the final dry mass and the initial mass of the samples, according to eq 2, where  $M_s$  is the mass of the sample after drying and  $M_i$  is the initial mass of the sample.

$$ML = \frac{M_i - M_s}{M_i}$$

#### 4.2.2.8 Hemagglutinating activity

The hemagglutinating activity test was carried out in a Petri dish (6 cm × 1 cm), with the films divided into six groups, three at 2.5% cross-linking and three at 5.0%. Samples of 2 mL of 25 mM Tris-HCl (pH 7.6) were added to all groups and then 3 mL of 3% native rabbit erythrocytes and subsequent incubation for 2 h, thus obtaining the result.

#### 4.2.2.9 Title of hemagglutination activity

In 5 mL test tubes, an aliquot of 50 μL of 25 mM Tris-HCl at pH 7.6 was added, followed by 50 μL of serial dilution, with the final tube reaching a total volume of 100 μL. This dilution was performed in each of the six groups of films, which were continuously extracted with PBS using a homogenizer. This process was repeated at 15, 30, 60, 90, 120, and 150 minutes. Subsequently, 50 μL of 3% native rabbit erythrocytes were added at all time points. After 3h and 6h incubation periods, monitoring ensued. Tests were performed in triplicate.

### 4.2.3 Physical characterization

#### 4.2.3.1 Differential Scanning Calorimetry

The thermal properties of the dried film were measured on the differential scanning calorimetry (DSC) Q20 (TA Instruments). The samples were placed in hermetic aluminum cells and evaluated from 35 to 280 °C at a heating rate of 10 °C/min under a nitrogen atmosphere.

#### 4.2.3.2 FTIR spectra

The FTIR spectra of the films were registered in FTIR spectrophotometer (PerkinElmer Spectrum Two), using the ATR (attenuated total reflectance) mode to provide information on the functional groups. The spectra were recorded between 400  $\text{cm}^{-1}$  and 4000  $\text{cm}^{-1}$  by 32 scans integrated per spectrum at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3.3 Scanning Electron Microscopy

The micrographs were taken using a scanning electron microscope (SEM) with a field emission gun, FEI brand, model Quanta FEG 250, with an accelerating voltage of 15 kV and spot 4.0 on the secondary electron and backscattered electron detectors. To take the micrographs, the samples were fixed to an aluminum substrate (stub) using double-sided carbon adhesive tape and grounded with carbon paint.

#### 4.2.3.4 Rugosity Profile

The quantitative analysis of average surface roughness (Ra) and topography of the films were measured by confocal laser scanning microscope (CLSM; LSM700, Carl Zeiss). The roughness parameters were determined by the visualization software using a surface area of 100  $\mu\text{m}^2$ .

### 4.2.4 Angiogenic activity assessment

#### 4.2.4.1 Chick embryo chorioallantoic membrane assay

The angiogenic effect of ConA film was assessed by the chorioallantoic membrane (CAM) assay, based on the protocol described by Auerbach et al. with modifications.<sup>22</sup> Thirty-five fertilized hen eggs (*Gallus gallus domesticus*) were housed in a BOD chamber (model SL224) with a humidified atmosphere ( $70 \pm 4\%$  relative humidity) and controlled temperature (35 °C). On the seventh incubation day, the eggshell was subjected to a circular opening at the egg-wider base to remove the shell membrane. Then, the eggs were sealed and reincubated. On the 12th incubation day, the eggs were randomized (five eggs/group) into seven treatment groups: (1) negative control film 2.5% cross-linking; (2) negative control film 5% cross-linking; (3) 50

$\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA film 2.5% cross-linking; (4) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA film 5% cross-linking; (5) 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA film 2.5% crosslinking; (6) 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA film 5% cross-linking; and (7) 20  $\mu\text{L}$  healing oil Dersani (angiogenesis inducer). After 72 h, the CAMs were fixed in methanal ( $\text{CH}_2\text{O}$ ; 10%), and the angiogenic effect was quantified from captured images (Nikon Coolpix L810 16.1 megapixels). The vascularization percentage was determined by ImageJ (version 1.51 j8) software. The length and caliber of blood vessels, number of complexes and junctions were determined by AngioQuant (version 1.33) software. Histological analysis of CAM was performed after tissue processing and hematoxylin–eosin (HE) staining of samples. The histological parameters (neovascularization, presence of inflammatory elements, fibroblasts, and thickening of the chorioallantoic membrane) were visually classified according to the quantity and/or intensity in the CAM histological sections using a light microscope (Olympus, model BH2) with a 40 $\times$  objective lens. The data obtained were transformed into quantitative variables, assigning the following scores: (0) absent, (1) discrete, (2) moderate, and (3) intense.

#### 4.2.4.2 Immunohistochemistry of CAM

For immunodetection of angiogenic factors in treated CAMs, methanal-fixed and paraffin-embedded samples were cut at 4  $\mu\text{m}$  on silane-coated (4%  $\text{SiH}_4$ ) microscopic slides. Dewaxed samples underwent heat-induced antigen retrieval in a water bath (97  $^\circ\text{C}$ ) immersed in citrate buffer (10 mM; pH 6.0) for 40 min, followed by quenching of endogenous peroxidase activity with hydrogen peroxide (3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) for 20 min. Subsequently, each histological sample was incubated with primary antibodies against vascular endothelial growth factor (VEGF; 1:400 mouse monoclonal IgG, sc-53462; Santa Cruz Biotechnology) or transforming growth factor beta ( $\text{TGF-}\beta$ ; 1:400 polyclonal rabbit IgG, sc-7892; Santa Cruz Biotechnology) in a humid chamber at 4  $^\circ\text{C}$  overnight. The immune complexes were treated with peroxidase-conjugated affinipure goat secondary antibody (1:500 antimouse IgG, 113-035-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 3 h at room temperature. The immunoreactivity was detected by Novocastra DAB (1:50) chromogen substrate for 10 min, and the sections were counterstained with Harris' hematoxylin.<sup>23</sup> To quantitatively evaluate the VEGF and  $\text{TGF-}\beta$  levels, an average percentage of positive cells was determined derived from 5 photomicrographs of random areas obtained in a light microscope with magnification of 40 $\times$  by ImageJ (version 1.5 j8) software.

#### **4.2.5 Statistics analysis**

The data analysis was carried out using the GraphPad Prism 6.0 statistical program. Data were analyzed with two-way ANOVA, using the geometric mean of the triplicates and the standard deviation of the mean as central data. Significant differences between means were identified using the Tukey test. For macroscopic, histological, and immunohistochemical evaluations regarding angiogenic analysis, the data obtained were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test using the SigmaStat software (version 3.5). For all data,  $p < 0.05$  was considered significant.

### **4.3 Results and discussion**

#### **4.3.1 Film characterization**

##### *4.3.1.1 Visual aspect*

This study offers a new perspective on the therapeutic application of plant lectins by incorporating these proteins into sodium alginate and carboxymethylcellulose films, using them as vehicles for compounds with angiogenic properties. Lectins in alginate films have already been studied regarding their antimicrobial activity against candidiasis, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>16,24</sup> Characterizing these films is crucial because their properties can significantly influence the outcomes. Regarding the visual characterization of the alginate/CMC polymeric films produced in this study, we observed that they are macroscopically homogeneous and free of cracks (Figure 7A–F). Additionally, these films are transparent, flexible, have smooth surfaces, and contain small air bubbles. Small transparency contrasts are observed in films with higher cross-linking (Figure 7D,F) and higher amounts of ConA lectin (Figure 7C,F) compared to the control (Figure 7A,D).

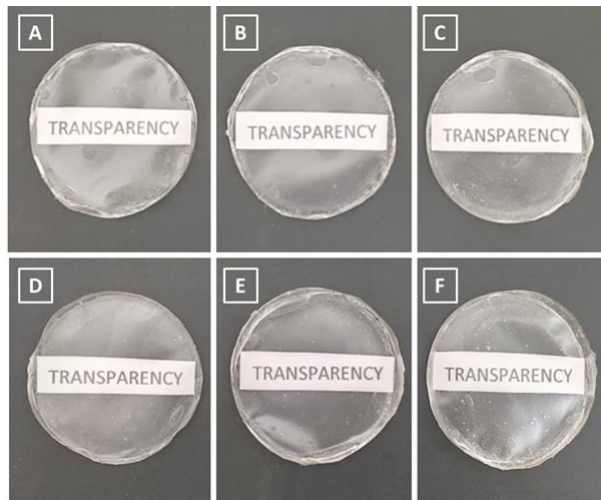


Figure 7. Visual appearance of cross-linked alginate/CMC films with or without ConA. (A) Control: alginate/CMC film at 2.5% cross-linking containing NaCl; (B) ConA 50  $\mu\text{g}$  in 2.5% cross-linking; (C) ConA 200  $\mu\text{g}$  at 2.5% cross-linking; (D) control at 5% cross-linking; (E) ConA 50  $\mu\text{g}$  in 5% cross-linking; (F) ConA 200  $\mu\text{g}$  in 5% cross-linking.

More transparent films tend to be more effective, providing better monitoring of macroscopic aspects of the study target, such as wounds,<sup>25</sup> due to greater homogeneity and better dispersion of components. Macedo et al.<sup>16</sup> observed that films containing the ConA and the antibiotic Gentamicin were also more transparent when compared to the control. The same was observed by Bazań et al.<sup>24</sup> by including the lectins ConBr and MaL in alginate films. Transparency results from the effective dilution of the compounds in the films, indicating that alginate can dilute and diffuse proteins.<sup>26</sup> In our tests it is possible to observe a high level of transparency, similar in all groups, indicating a complete and uniform dilution of the compounds present. For an effective film, it must present certain characteristics, such as good resistance, adhesion, and mechanical support in the tissues to which it will adhere, among others.<sup>27</sup>

Regarding the thickness of the alginate/CMC films, as shown in Table 2, there are no statistically significant differences between the treated groups and the control group. These results suggest that variations in cross-linking conditions and the presence or absence of ConA have no impact on film thickness.

Table 2. Film Thickness (ConA) of Alginate and CMC (1:1) Obtained with Cross-Link Concentrations of 2.5% and 5%<sup>a</sup>

Cross-linking (2.5%)	Thickness ( $\mu\text{m}$ )
Group 1	0.0355
Group 2	0.038
Group 3	0.0355
Cross-linking (5.0%)	Thickness ( $\mu\text{m}$ )
Group 1	0.0355
Group 2	0.038
Group 3	0.0375

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  standard deviation. Not significant ( $p > 0.05$ ) Tukey test.

The results highlighted in Table 3 regarding swelling and mass loss reveal significant statistical differences within the same cross-linking groups and between different cross-linking agents. It is evident that the films containing ConA at 2.5% cross-linking exhibited a higher swelling rate compared to the control film. At 5% cross-linking, however, the swelling degree decreased for all groups, with group 2 showing the highest value among the ConA-containing films.

Table 3. Degree of Swelling and Mass Loss of Alginate and CMC (ConA) Film (1:1) Obtained with Crosslinking Concentrations of 2.5% and 5%<sup>a</sup>

Crosslinking concentration (2.5%)	Degree of swelling (mg H <sub>2</sub> O film)	Mass loss
Group 1	596.4 $\pm$ 0.3 <sup>Aa</sup>	23.5 $\pm$ 0.25 <sup>aA</sup>
Group 2	675.6 $\pm$ 1.47 <sup>Ba</sup>	20.0 $\pm$ 0.26 <sup>bB</sup>
Group 3	664.0 $\pm$ 0.87 <sup>Ca</sup>	20.3 $\pm$ 0.37 <sup>bB</sup>
Crosslinking concentration (5.0%)	Degree of swelling (mg H <sub>2</sub> O film)	Mass loss
Group 1	584.4 $\pm$ 0.75 <sup>aB</sup>	22.1 $\pm$ 0.34 <sup>aB</sup>
Group 2	609.4 $\pm$ 0.60 <sup>bB</sup>	21.3 $\pm$ 0.46 <sup>aB</sup>
Group 3	572.0 $\pm$ 1.41 <sup>cB</sup>	19.8 $\pm$ 0.20 <sup>bB</sup>

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  standard deviation. Lowercase letters represent statistical differences within the same cross-link agent, and uppercase letters represent statistical differences between cross-link agents ( $p < 0.05$ ), Tukey test.

Analysis of mass loss showed that at 2.5% cross-linking, control films had the greatest loss, while at 5% cross-linking, films with the highest concentration of ConA had the lowest mass loss. This indicates that increased cross-linking implies lower swelling capacity, since cross-linking prevents water from penetrating the interior of the film, and consequently less mass loss due to the outermost groups, which must be related to mass loss, being more protected after cross-linking. Among films prepared with varying concentrations of ConA using  $\text{CaCl}_2$  as a cross-linking agent, control films with 2.5% show statistically significant differences compared to all other groups. These findings underline the significant influence of ConA addition and cross-linking on the swelling and mass-loss properties of alginate/CMC films.

According to Boateng et al.,<sup>28</sup> the ideal thickness, however, will provide high absorption capacity, and the texture and porosity of the material also controls this property. The thickness of the film is a key factor for success. Very thin films are more fragile, adhere less, have limited mechanical properties, and dissolve easily when applied to tissue. However, the thickness primarily relates to the film's intended purpose.<sup>29</sup> The literature does not indicate an ideal thickness for polymeric films, since this property depends on the body region to be treated, which shows that the thicknesses of the films obtained in this work have potential for application in wound treatment.

#### *4.3.1.2 Hemagglutinating Activity and Title of hemagglutinating activity*

Another crucial characteristic of these films is their absorption capacity. Wounds on the surface of the skin can generate exudate, and when in excess, they hinder the adequate transport of oxygen and water, in addition to promoting the emergence of edema and bacterial infections.<sup>30</sup> For this reason, films must promote appropriate water absorption to prevent the accumulation of exudate and thus promote healing. Furthermore, a film with good water retention maintains wound moisture, being crucial for adhesion, differentiation, cell proliferation, pain reduction and activation of collagen synthesis.<sup>31,32</sup>

The analysis of hemagglutinating activity in the films showed the expected absence of activity in the control films (group 1) (Figure 8A,D) and the presence of activity in the ConA containing groups (groups 2 and 3) (Figure 8B,C,E,F). An additional finding highlights the influence of cross-linking on ConA-containing alginate/CMC films, where activity was more

prominent in 2.5% cross-linked alginate/CMC films (Figure 8B,C) compared to 5% cross-linked alginate/CMC films (Figure 8E,F). Although no previous studies directly address ConA release from alginate/CMC films, the trend is consistent with fundamental principles of polymer cross-linking and diffusion.<sup>15</sup>

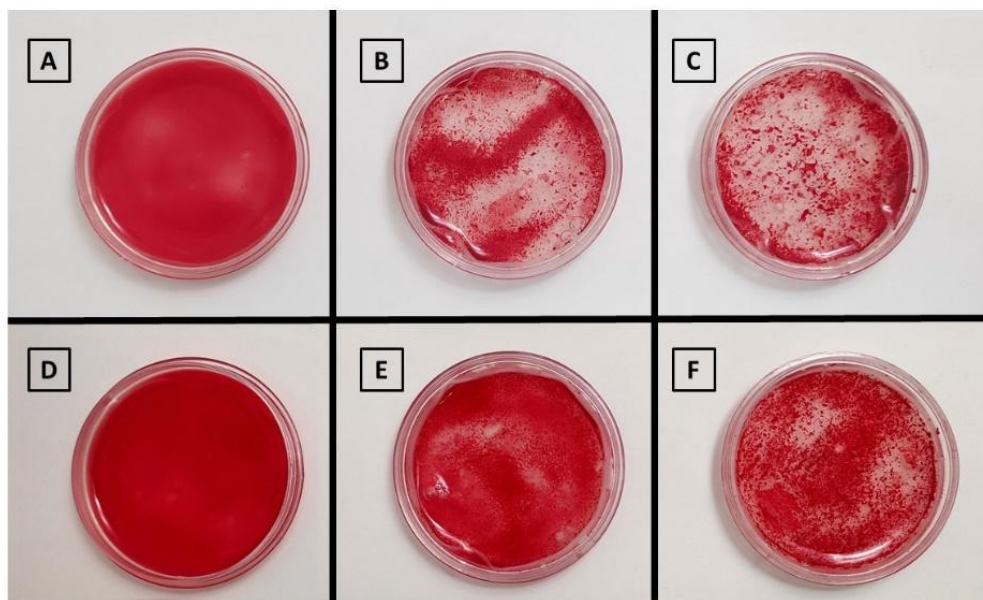


Figure 8. Assessment of the hemagglutinating activity of films CMC/alginate (1:1) containing (A) 2.5% cross-linking control; (B) 2.5% crosslinking ConA 50  $\mu\text{g}$ ; (C) 2.5% cross-linking ConA 200  $\mu\text{g}$  (D) 5% cross-linking control; (E) 5% cross-linking ConA 50  $\mu\text{g}$  in (F) 5% cross-linking ConA 200  $\mu\text{g}$ .

To confirm the variation in lectin release rates in films with different degrees of cross-linking (2.5% and 5%), hemagglutinating activity titers were evaluated. As shown in Figure 9, films with 200  $\mu\text{g}$  of ConA and 2.5% cross-linking reached maximum release in 90 min and remained stable until 150 min, with hemagglutinating activity of 8 HU. In contrast, films with the same concentration but 5% cross-linking reached maximum release in 120 min and remained stable until 150 min, with an activity of 16 HU.

For films with 50  $\mu\text{g}$  of ConA, maximum release occurred in 60 min for 2.5% cross-linking and in 90 min for 5% cross-linking. Notably, activity was lost after 150 min in the 5% cross-linked films.

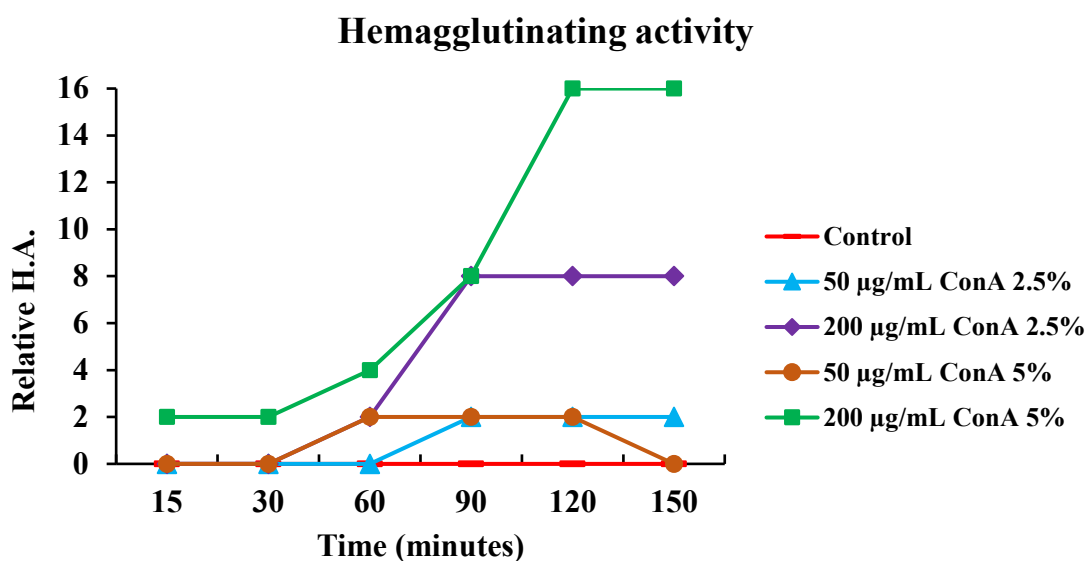


Figure 9. Film hemagglutinating activity (ConA) titers after the two types of cross-linking processes.

Alginate-based films tend to have good water absorption, as this polymer acts as an antidehydration agent, being recommended for dressings on wounds with a high exudate content.<sup>33,34</sup> In this work, we found that the films in all groups had a good water absorption capacity, as indicated by the degree of swelling shown in Table 3, proving to be physically stable in the presence of liquid media, maintaining the absorption capacity that is necessary for applications such as dressings. These data are corroborated by Gontijo and Bierhalz,<sup>35</sup> who found similar data in their tests with alginate and carboxymethylcellulose (CMC) films incorporated with sodium diclofenac.

### 4.3.2 Physical characterization

#### 4.3.2.1 Differential scanning calorimetry analyzes

The thermal processes of combined/or modified films and its pure counterpart were assessed by differential scanning calorimetry analysis (DSC). The results are shown in Figure 7 and compared to the thermal transitions of pristine and combined alginate films, exhibiting the influence of the modifying moiety on the anionic linear polysaccharide stability. The DSC thermograms of pure alginate membrane with 2.5% of  $\text{CaCl}_2$  exhibited an endothermic peak at 92.40 °C related to the evaporation of absorbed water or by vaporization of volatile components for both content of  $\text{CaCl}_2$  (Figure 10A, group I — black curve). For the pure alginate membrane with 5% of  $\text{CaCl}_2$  (Figure 10A — yellow curve) the endothermic peak shifted to

lower temperature (84.50 °C).<sup>36</sup> In the case of the addition of ConA lectin to the alginate/ CMC films, the DSC curves showed an endothermic peak at 94 °C (for 2.5% CaCl<sub>2</sub>) and 81 °C (for 5% CaCl<sub>2</sub>) followed by a small exothermic peak (Figure 10B, group II, black and red curves, respectively). By analyzing the exothermic point in the temperature range 220–230 °C for both reported samples, we noticed that from there, partial depolymerization of the alginate chain begins. As for alginate/CMC films with ConA and NaCl, the endothermic peak changed to 69 °C (for 2.5% CaCl<sub>2</sub>) and 78 °C (for 5% CaCl<sub>2</sub>) and the endothermic region changed to a higher temperature range (Figure 4C, group III, black and green curves, respectively). Alginate/CMC films containing ConA and NaCl tend to retain less water, which volatilizes more easily compared to pure alginate/CMC films.

These findings, when correlated with the water affinity, indicate that the presence of the lectin made the membrane water interaction less intense, leading to a shift in the first endothermic peak when compared to the pure sample. Furthermore, the presence of ConA and NaCl in the composition did not change the stabilizing capacity of the membrane, since the thermal behaviors at high temperature were similar, but significantly changed the temperature of the dry polymer glass transition (related to the endothermic peak).<sup>36</sup>

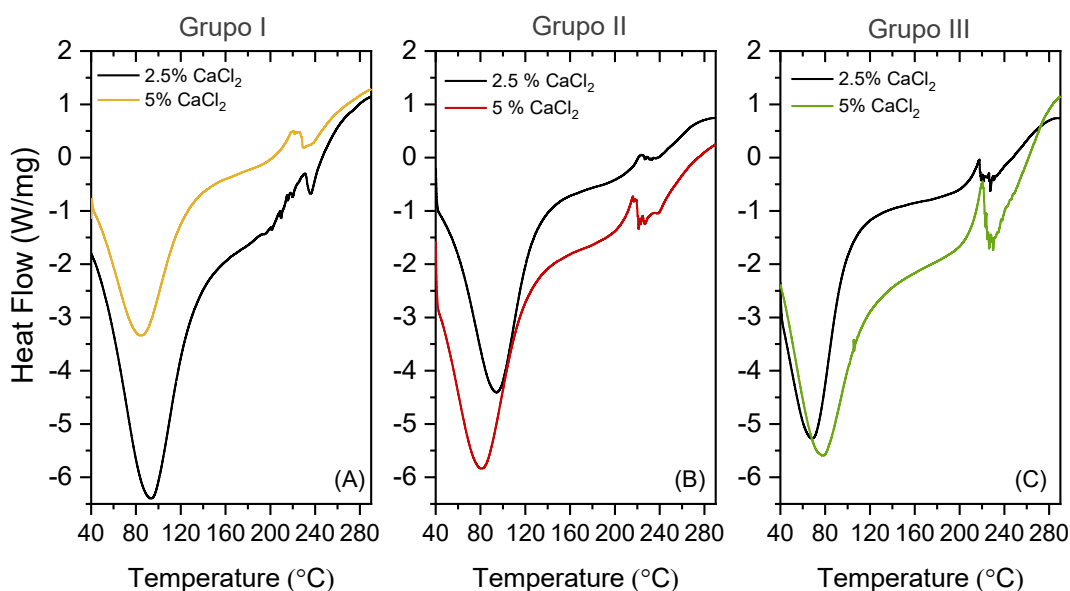


Figure 10. DSC thermograms. (A) Group I: alginate/CMC film with NaCl and 2.5% or 5% of CaCl<sub>2</sub>. (B) Group II: alginate/CMC film with ConA and 2.5% or 5% of CaCl<sub>2</sub>. (C) Group III: alginate/CMC film with NaCl and ConA and 2.5% or 5% of CaCl<sub>2</sub>.

Regarding aspects of physical analysis, partial depolymerization of the alginate chain was observed when the exothermic point reached the reported samples in a temperature range of 220–230 °C.<sup>37</sup> Furthermore, films cross-linked with ConA and NaCl tend to retain less water, which in turn volatilizes more easily than in the control film. Such findings, when correlated with water affinity, indicate that the presence of the lectin made the film water interaction less intense, leading to a shift in the first endothermic peak when compared to the pure sample. Furthermore, the presence of ConA and NaCl in the composition did not change the stabilizing capacity of the membrane, as the thermal behaviors at high temperatures were similar, but it significantly changed the glass transition temperature of the dry polymer (related to the endothermic peak).<sup>36</sup>

#### 4.3.2.2 FTIR analyzes

The FTIR spectra of groups I (with NaCl), II (with ConA) and III (with NaCl and ConA) were recorded and compared (Figure 11). Initially, the spectra of the alginate/CMC film (group I), cross-linked with  $\text{Ca}^{2+}$  under both  $\text{CaCl}_2$  conditions, exhibited significant absorption bands related to hydroxyl and carboxylic functional groups (Figure 11, group I, curves a and b). In the range of  $3220\text{ cm}^{-1}$  to  $3350\text{ cm}^{-1}$ , the intermolecular/intramolecular hydrogen-bonded O–H stretching vibration of alginate/CMC film was prominently observed, overlapping the structural N–H vibration.<sup>38,39</sup> Distinct stretching vibrations of C–H were noted at  $2880\text{ cm}^{-1}$  and  $2935\text{ cm}^{-1}$ . The bands at  $1560\text{ cm}^{-1}$  and  $1411\text{ cm}^{-1}$  were assigned to asymmetric and symmetric stretching vibrations of  $\text{COO}^-$  groups. At lower frequencies, the bands at  $1034\text{ cm}^{-1}$  and  $924\text{ cm}^{-1}$  were attributed to C–O stretching, incorporating contributions from C–C–H and C–O–H deformation, as well as absorption band of  $\alpha$ -(1,4) glycoside bond, respectively.<sup>40</sup> The pronounced absorption band at  $1034\text{ cm}^{-1}$  is associated with glycosidic linkages in both CMC and alginate.

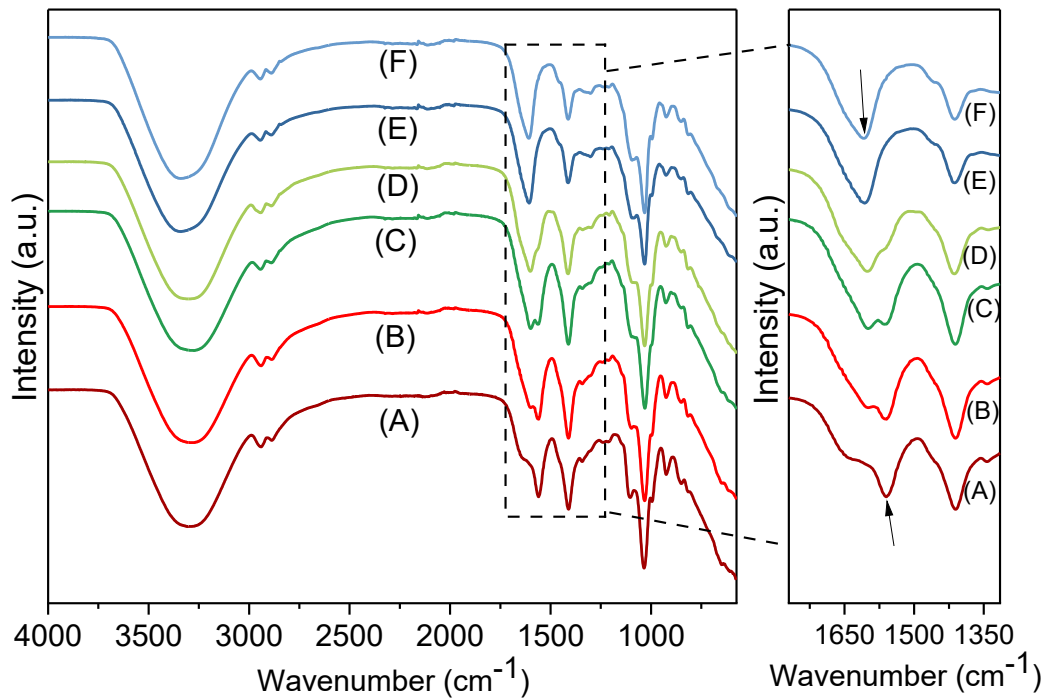


Figure 11. FTIR analyzes. Group I: (A) spectra of alginate/CMC film with NaCl and 2.5%  $\text{CaCl}_2$ , and (B) 5% of  $\text{CaCl}_2$ . Group II: (C) spectra of alginate/CMC film with lectin ConA with 2.5%, and (D) 5% of  $\text{CaCl}_2$ . Group III: (E) spectra alginate/CMC film with NaCl and lectin ConA with 2.5%, and (F) 5% of  $\text{CaCl}_2$ .

In both conditions of alginate/CMC films with ConA lectin (Figure 11, groups II and III, curves C–F), the characteristic bands of the pure sample were evident in the control sample, indicating the preservation of structure and primary interactions. The addition of ConA to the film composition resulted in changes in the region between  $1750\text{ cm}^{-1}$  and  $1480\text{ cm}^{-1}$ , indicating a possible interaction between the active groups of ConA and the functional groups of the film, especially the carboxylate groups ( $\text{COO}^-$ ). These FTIR data suggest that ConA is anchored in the alginate matrix not only due to the cross-linked nature of the film chain, but also through possible direct interactions or cross-linking with these functional groups. FTIR data suggest that ConA is anchored in the alginate matrix due to the cross-linked nature of the film chain, with minimal chemical interactions (or chemical bonds).<sup>40</sup> It is noteworthy that the presence of ConA gradually suppressed the contribution at  $1560\text{ cm}^{-1}$  and revealed a band at  $1607\text{ cm}^{-1}$ , potentially attributed to a cross-linked lectin–alginate network formed by carbonyl groups (Figure 11, representative arrows).<sup>41</sup> Consequently, the synergistic chemical

environment between the film and the lectin facilitated the complete action of ConA as a hemagglutinating agent.

Approaches to studying the molecular interactions of the film samples and their components revealed bands attributable to the stretching (axial deformation) of the intertwined hydroxyl structural groups ( $-OH$  and  $-OH$ ), characteristic of natural polysaccharides.<sup>27</sup> In relation to those found in regions of low-frequency bands of  $Ca-C$  stretching vibrations, the rotational vibrations of the  $CH_3$  group are attributed to different skeletal vibrations.<sup>36-43</sup> Nevertheless, the results show a clear interplay between the lectin and the chemical groups of the film as shown in Table S1.<sup>44</sup>

#### 4.3.2.3 Scanning Eletronic Microscopy

The morphological characterization by scanning electron microscopy (SEM) of films composed of alginate and carboxymethyl cellulose (CMC) incorporated with *C. ensiformis* lectin (ConA) revealed images that evidenced distinct but complementary aspects of the morphology of the films. The magnitude presented is  $5000\times$  ( $20\ \mu m$ ) as illustrated in Figure 9.

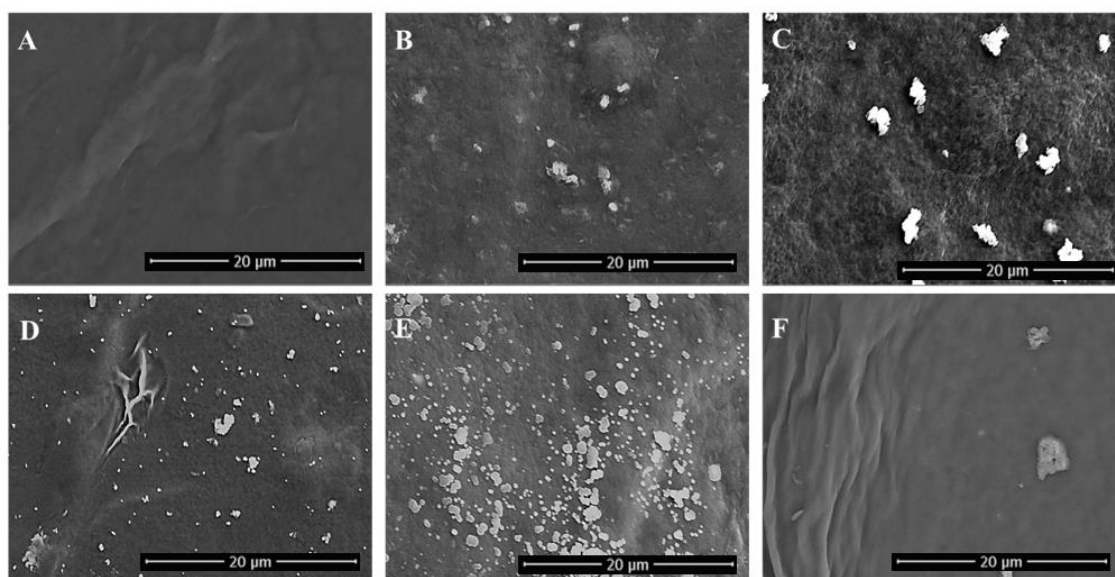


Figure 12. Scanning electron microscopy of the films: ConA ( $50\ \mu g/mL$ ) with 2.5% (A); ConA ( $50\ \mu g/mL$ ) with 5.0% (B); ConA ( $200\ \mu g/mL$ ) with 2.5% (C); ConA ( $200\ \mu g/mL$ ) with 5.0% (D); control group with 2.5% (E); control group with 5.0% (F).

The micrographs highlight a relatively rough (Figure 12A– C,F) surface with interconnected (Figure 12D) regions that favor cell adhesion and proliferation. These morphologies are compatible with ideal substrates for supporting endothelial cells, promoting migration and the

formation of capillary structures.<sup>45</sup> A marked contrast is observed in certain areas, which may indicate regions with higher ConA density (Figure 12C). The presence of this lectin is crucial, as it has a high affinity for mannose and glucose residues in cell surface glycoproteins, potentially facilitating cell-material interactions.<sup>26</sup> ConA is known to induce bioactive responses such as cell proliferation and modulation of the inflammatory response, as well as to enhance tissue revascularization. Surface roughness also promotes the formation of new blood vessels, providing a permissive interface for in situ revascularization.<sup>46</sup> The morphological characterization presented here strengthens the argument that these biomaterials may serve as bioactive platforms to support angiogenesis.

#### *4.3.2.4 Roughness profile of the films*

The dynamics of surface roughness of groups I (with NaCl), II (with ConA) and III (with NaCl and ConA) were examined by confocal laser scanning microscopy. For each sample, the average roughness (Ra) and surface topography were displayed in Figure 13. The Ra values of the alginate/CMC films with NaCl and 2.5% or 5% CaCl<sub>2</sub> (group I), alginate/CMC films with ConA lectin with 2.5% or 5% CaCl<sub>2</sub> (group II) and alginate/CMC films with NaCl and ConA lectin with 2.5% or 5% CaCl<sub>2</sub> (group III) were  $0.480 \pm 0.08 \mu\text{m}$  and  $1.430 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ;  $0.540 \pm 0.04 \mu\text{m}$  and  $3.370 \pm 0.04 \mu\text{m}$ ;  $0.910 \pm 0.07 \mu\text{m}$  and  $4.110 \pm 0.09 \mu\text{m}$ , respectively. A significant increase was observed in surface roughness profile in the presence of ConA and NaCl. Also was observed that the surface roughness of each pair increased with increasing CaCl<sub>2</sub> concentration and consequently, more surface area was available for lectin attachment through nonspecific interactions. It was easily noticed that the surface roughness substantially increased with increasing the ConA content and in the presence of NaCl, regardless of the CaCl<sub>2</sub> amount compared to the unmodified membrane. This behavior is explained as the addition of ConA in the film might result in the formation of an amorphous-like structure and the creation of more structural pores and sorption centers due to the large difference in the miscibility degree between the film and the ConA lectin, which produced significant differences in surface roughness. A film with greater surface roughness could provide a more effective surface for reactions that occurs exclusively in that interface.<sup>47</sup>

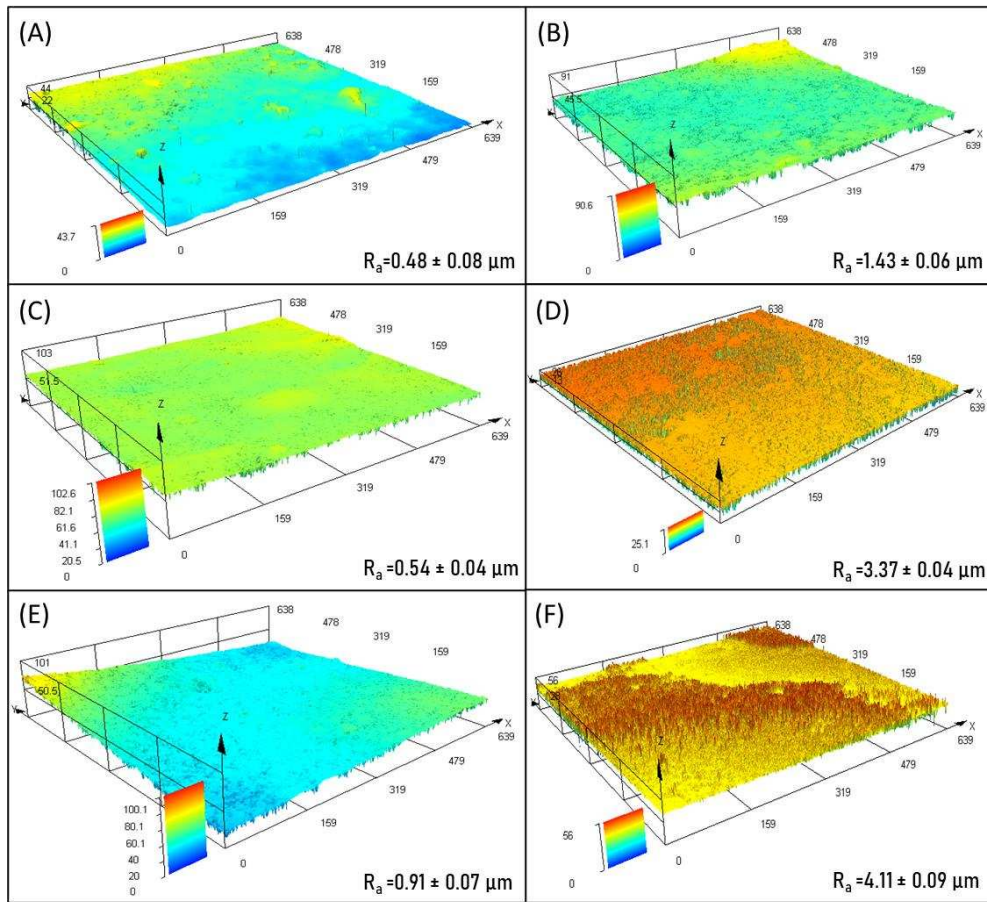


Figure 13. Confocal laser scanning microscopy images showing surface roughness ( $R_a$ ) of the films: (A,B) alginate/CMC films with NaCl and 2.5% or 5%  $\text{CaCl}_2$ , respectively; (C,D) alginate/CMC films with ConA and 2.5% or 5%  $\text{CaCl}_2$ , respectively; (E,F) alginate/CMC films with NaCl and ConA and 2.5% or 5%  $\text{CaCl}_2$ , respectively.

It was seen that the surface roughness of the films increased with increasing  $\text{CaCl}_2$  concentration and, consequently, more surface area was available for lectin binding through nonspecific interactions. It was easily noticed that the surface roughness increased substantially with increasing ConA content and in the presence of NaCl, regardless of the amount of  $\text{CaCl}_2$  compared to the unmodified film. This behavior is explained because the addition of ConA into the matrix can result in the formation of an amorphous structure and the creation of more structural pores and sorption centers due to the large difference in the degree of miscibility between the film and the lectin, which produced significant differences in the surface roughness. A film with greater surface roughness could provide a more effective surface for reactions that occur exclusively at this interface.<sup>26</sup> The roughness of dermal dressings influences cell adhesion and proliferation, as well as the shape taken on by cells when cultured on a given

surface. As such, roughness is an important factor that determines the biocompatibility of a material.<sup>48</sup> According to Milleret et al.,<sup>49</sup> the rougher the surface, the greater the adhesion of platelets and the formation of thrombin, which are favorable conditions for accelerating the healing of skin lesions. It has also been reported that the greater the roughness of a skin dressing, the greater the anchorage between the surface and the necrotic tissue of the wound.<sup>50</sup>

### 4.3.3 Angiogenic Activity

#### 4.3.3.1 ConA angiogenic activity in CAM assay

The CAM assay results demonstrated that ConA induced a pronounced angiogenic effect, since it promoted a significant increase in all the parameters analyzed, including percentage of vascularization (Figure 14), length and caliber of blood vessels, and number of complexes and junctions (Table 4) at 50 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations (2.5 or 5% cross-linking) when compared to the negative control ( $p < 0.05$ ).

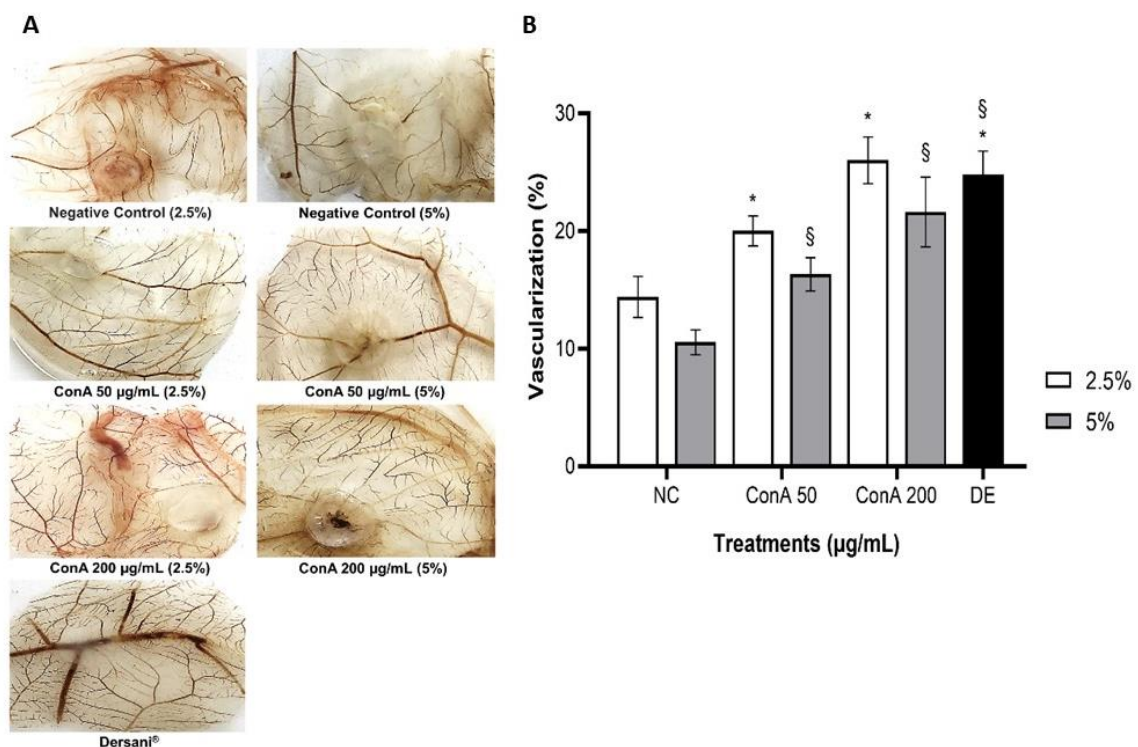


Figure 14. Angiogenic effect of ConA by chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. (A) Representative images of different CAM after 72 h of treatments. (B) Average vascularization percentage obtained from each treatment by ImageJ software. NC: negative control: cross-linking solution + 150 mM NaCl; ConA: cross-linking solution + concanavalin A lectin (50 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 150 mM NaCl. DE: healing oil Dersani (angiogenesis inducer).

ANOVA and posthoc Tukey test. \* Significant difference compared to the negative control 2.5% ( $p < 0.05$ ); § significant difference compared to the negative control 5% ( $p < 0.05$ )

Table 4. Means  $\pm$  Standard Deviation of Parameters Analyzed in Chick Embryo Chorioallantoic Membranes (CAM), Treated with Different Concentrations of ConA by AngioQuant Software<sup>a</sup>

Treatments ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Length (Pixel)	Caliber (Pixel)	Number of complexes	Number of junctions
Dersani 2.5%	343.1 $\pm$ 23.2*	2155.0 $\pm$ 217.7*	267.0 $\pm$ 13.7*	299.2 $\pm$ 23.3*
Negative Control	115.2 $\pm$ 28.0	650.9 $\pm$ 286.3	98.6 $\pm$ 41.1	55.8 $\pm$ 28.7
ConA 50	200.5 $\pm$ 50.0*	1420.0 $\pm$ 404.9*	127.2 $\pm$ 16.5*	116.5 $\pm$ 29.8*
ConA 200 5%	299.7 $\pm$ 30.3*	2075.1 $\pm$ 394.6*	234.7 $\pm$ 14.5*	275.0 $\pm$ 20.3*
Negative Control	81.2 $\pm$ 12.2	677.5 $\pm$ 135.9	77.4 $\pm$ 13.0	40.2 $\pm$ 10.0
ConA 50	162.7 $\pm$ 34.0*	1590.0 $\pm$ 383.3*	98.8 $\pm$ 27.0*	105.5 $\pm$ 53.8*
ConA 200	202.8 $\pm$ 15.3*	1893.5 $\pm$ 352.7*	109.5 $\pm$ 17.2*	114.3 $\pm$ 20.8*

<sup>a</sup> Healing oil Dersani (angiogenesis inducer); Negative control: crosslinking solution + 150 mM NaCl; ConA: crosslinking solution + Concanavalin A lectin (50 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 150 mM NaCl. ANOVA and post-hoc Tukey test. \*Significant difference compared to the negative control ( $p < 0.05$ ).

This effect was confirmed in the CAM histological analysis (Figure 15 and Table 5). In the ConA treated films, there was a significant increase in all histological parameters analyzed (neovascularization, presence of inflammatory and fibroblast cells and CAM thickening) at 50 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations (2.5 or 5% cross-linking), showing its inducing effect of the angiogenic process.

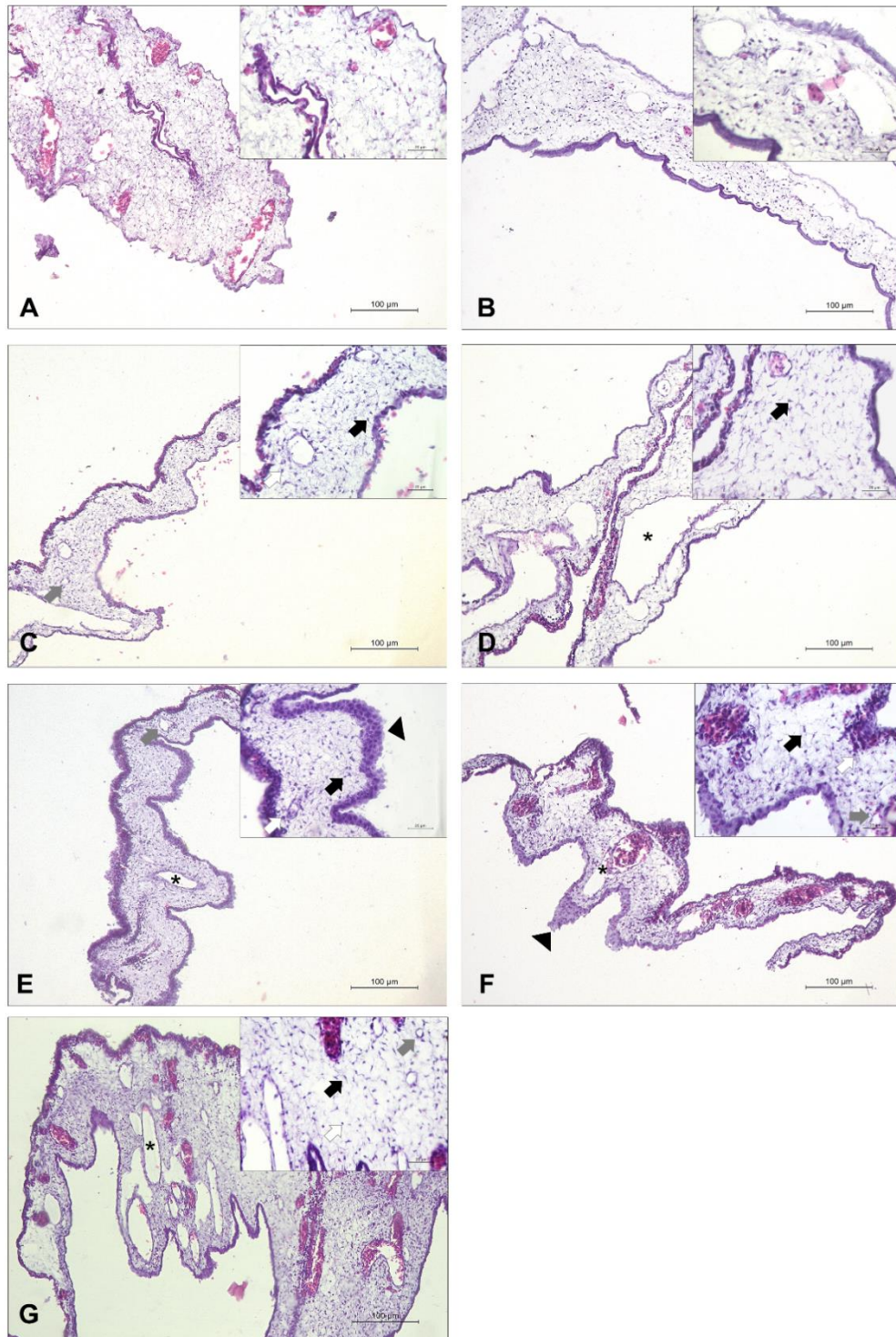


Figure 15. Representative photomicrograph of chick embryo chorioallantoic membranes stained by hematoxylin–eosin (HE), obtained from different treatment groups. (A) Negative control 2.5%; (B) negative control 5%; (C) ConA 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2.5%; (D) ConA 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5%; (E) ConA 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2.5%; (F) ConA 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5%. (G) Healing oil Dersani (angiogenesis inducer). Black arrow: fibroblasts; gray arrow: new vessels; white arrow: inflammatory cells; asterisk: pre-existing vessels; arrowhead: CAM thickening.

Table 5. Histological Analysis of Chick Embryo Chorioallantoic Membranes (CAM)<sup>a,b</sup>

Treatments ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Neovascularization	Presence of inflammatory cells	Presence of fibroblasts	Thickening in chorioallantoic membrane
Dersani 2.5%	$2.5 \pm 0.50^*$	$2.4 \pm 0.20^*$	$2.5 \pm 0.50^*$	$2.6 \pm 0.40^*$
Negative Control	$1.0 \pm 0.50$	$0.8 \pm 0.20$	$1.0 \pm 0.30$	$0.5 \pm 0.20$
ConA 50	$1.7 \pm 0.50^*$	$1.5 \pm 0.50^*$	$1.8 \pm 0.25^*$	$1.3 \pm 0.40^*$
ConA 200 5%	$2.8 \pm 0.25^*$	$2.5 \pm 0.44^*$	$2.8 \pm 0.20^*$	$2.0 \pm 0.00^*$
Negative Control	$0.5 \pm 0.30$	$0.5 \pm 0.20$	$0.5 \pm 0.15$	$0.8 \pm 0.20$
ConA 50	$1.2 \pm 0.10^*$	$1.2 \pm 0.20^*$	$1.6 \pm 0.40^*$	$1.0 \pm 0.00$
ConA 200	$2.0 \pm 0.33^*$	$1.8 \pm 0.22^*$	$2.2 \pm 0.15^*$	$1.6 \pm 0.20^*$

<sup>a</sup> Five CAM per treatment group were considered for the histological parameters analysis. Healing oil Dersani (angiogenesis inducer); negative control: cross-linking solution + 150 mM NaCl; ConA: cross-linking solution + concanavalin A lectin (50 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 150 mM NaCl. ANOVA and posthoc Tukey test. \* Significant difference compared to the negative control ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Means  $\pm$  standard deviation of histological parameters classified at a scale of 0–3.

Chronic inflammation, microbial infections, disturbance of angiogenesis, and reduced revascularization are some of the factors that hinder the wound healing process.<sup>35,50</sup> The angiogenic and proliferative potential of the ConA lectin has been previously described through the Akt/ERK/Cyclin D1 axis.<sup>19</sup> To date, there has been no study demonstrating the activity of conjugated lectin in films or in CAM analyses. Our study found that incorporating ConA lectin

into alginate and carboxymethylcellulose films did not compromise its angiogenic activity, indicating that the polymers' presence did not affect the lectin's angiogenic potential. The angiogenic effect is demonstrated by the increase in revascularization, length, and caliber of vessels and by the number of complexes and junctions. Findings like those of Rehman et al.,<sup>31</sup> who observed the angiogenic effect of a hydrogel dressing incorporated with graphene oxide. Increased vessel thickness is a sign of the maturation of nascent blood vessels and is possibly a result of higher angiogenesis.

Other studies with the presence of alginate in dressings show the angiogenic effect, as is the case of Azarpira et al.,<sup>51</sup> who demonstrated the potential role of VEGF-loaded alginate oxide particles in acellular collagen-alginate composite hydrogel to improve angiogenic activity. Silk fibroin/sodium alginate films promote revascularization and, consequently, angiogenesis<sup>52</sup>.

#### *4.3.3.2 ConA modulates VEGF and TGF- $\beta$ expression in CAM*

Immunohistochemistry of ConA treated CAM showed a significant increase in the expression of angiogenic factors analyzed in all treatment groups (Figure 16) compared to the negative control. Quantitative immunostaining analysis indicates that ConA-treated samples had significantly higher levels of TGF- $\beta$  (Figure 16A) and VEGF (Figure 16B) expression when compared to the negative control ( $p < 0.05$ ) at 50 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations (2.5 or 5% cross-linking).

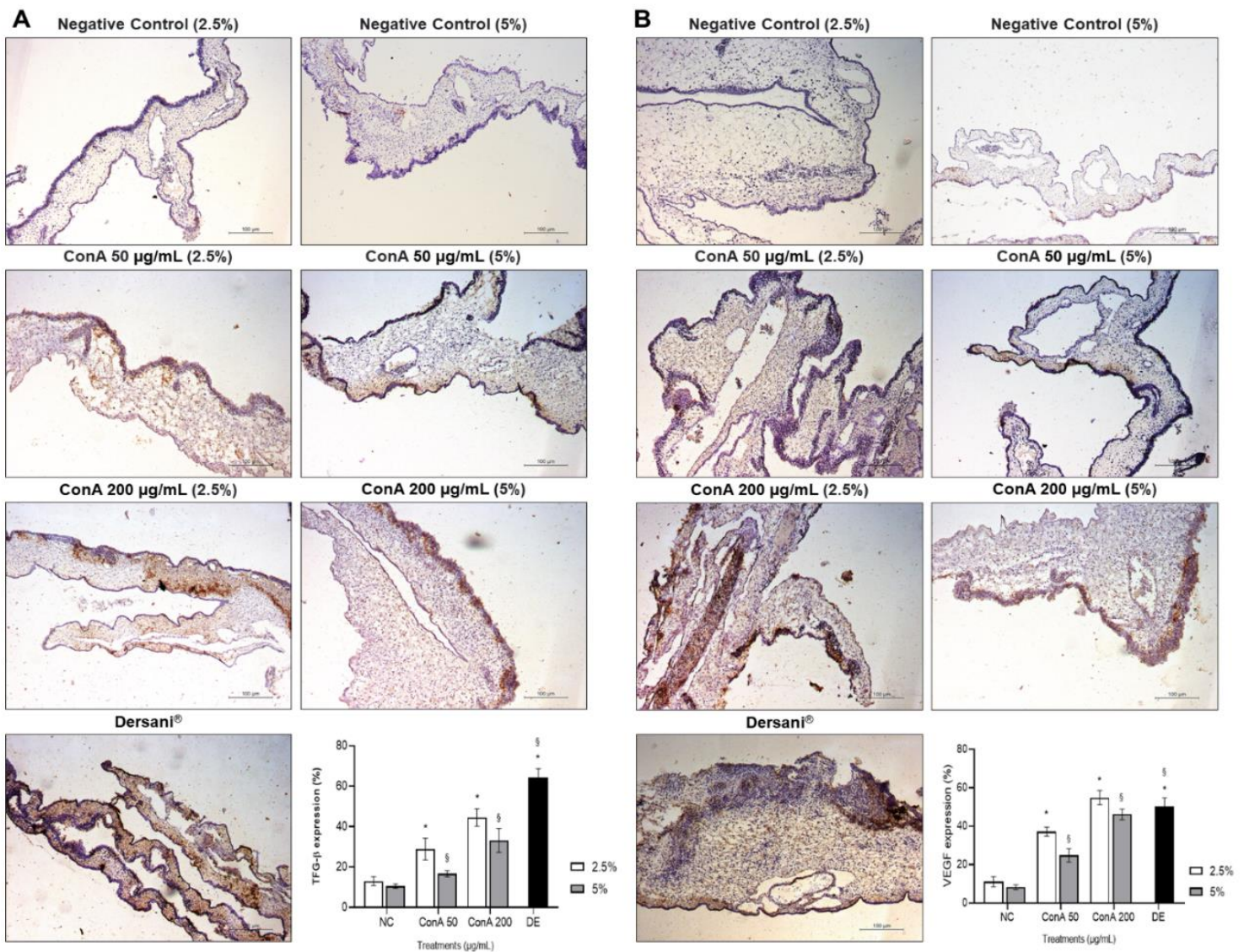


Figure 16. Immunodetection of angiogenic factors in chick embryo chorioallantoic membranes treated with ConA. (A) Immunostaining of vascular endothelial growth factor (VEGF); (B) immunostaining of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). The mean values obtained from each treatment were used to determine the expression (%). \* Significant difference compared to the negative control 2.5% ( $p < 0.05$ ); § significant difference compared to the negative control 5% ( $p < 0.05$ ).

We observed, through immunohistochemistry, that films conjugated with ConA present an increase in the expression of the angiogenic factors TGF- $\beta$  and VEGF. TGF- $\beta$  plays a crucial role in recruiting inflammatory cells, activating angiogenesis, stimulating extracellular matrix

(ECM) deposition, and removing the ECM once the wound has been properly closed. In turn, VEGF is essential for the formation of new blood vessel.<sup>20</sup>

## **5 Conclusion**

In this study, alginate/CMC films incorporated with ConA through calcium-mediated cross-links promoted angiogenesis and revascularization of the chorioallantoic membrane, likely due to increased expression of angiogenic factors (TGF- $\beta$  and VEGF). These films are promising for therapeutic applications that require induction of vascularization, such as wound healing and treatment of ischemic diseases, and may be crucial in the future treatment of diabetic wounds.

## **Declaration of conflict of interest**

There is no conflict of interest in this study.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to the Federal University of Cariri-UFCA and the Regional University of Cariri – UFCA for their support in carrying out the experiments, as well as the Cearense Foundation for Scientific and Technological Development Support - FUNCAP, National Council for Scientific and Technological Development - CNPQ and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES for all the financial support. We thank you for the financial support of the projects: 2020/15595-3 (FAPESP), 305816/2020-0 (CNPq) and 307199/2023-1 (CNPq).

## References

- (1) Stryker, Z. I.; Rajabi, M.; Davis, P. J.; Mousa, S. A. Evaluation of Angiogenesis Assays. *Biomedicines* 2019, 7, 37.
- (2) Rajabi, M.; Mousa, S. A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines* 2017, 5, 34.
- (3) Ylä-Herttuala, S.; Bridges, C.; Katz, M. G.; Korpisalo, P. Angiogenic Gene Therapy in Cardiovascular Diseases: Dream or Vision? *Eur. Heart J.* 2017, 38, No. ehw547.
- (4) Bisht, M.; Dhasmana, D.; Bist, S. Angiogenesis: Future of Pharmacological Modulation. *Indian J. Pharmacol.* 2010, 42, 2.
- (5) Su, W.-H.; Cheng, M.-H.; Lee, W.-L.; Tsou, T.-S.; Chang, W.-H.; Chen, C.-S.; Wang, P.-H. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Wounds: Pain Relief or Excessive Scar Formation? *Mediators Inflammation* 2010, 2010, 1–8.
- (6) Doderò, A.; Williams, R.; Gagliardi, S.; Vicini, S.; Alloisio, M.; Castellano, M. Characterization of Hyaluronic Acid by Dynamic Light Scattering and Rheological Techniques. *AIP Conf. Proc.* 2018, 1981, 020184.
- (7) Kalia, S.; Avérous, L. *Biopolymers*; Wiley, 2011.
- (8) Morozkina, S.; Strekalovskaya, U.; Vanina, A.; Snetkov, P.; Krasichkov, A.; Polyakova, V.; Uspenskaya, M. The Fabrication of Alginate-Carboxymethyl Cellulose-Based Composites and Drug Release Profiles. *Polymers* 2022, 14 (17), 3604.
- (9) Doderò, A.; Alloisio, M.; Vicini, S.; Castellano, M. Preparation of Composite Alginate-Based Electrospun Membranes Loaded with ZnO Nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2020, 227, 115371.
- (10) Maity, C.; Das, N. Alginate-Based Smart Materials and Their Application: Recent Advances and Perspectives. *Top. Curr. Chem.* 2022, 380, 3.
- (11) Cavada, B. S.; Osterne, V. J. S.; Lossio, C. F.; Pinto-Junior, V. R.; Oliveira, M. V.; Silva, M. T. L.; Leal, R. B.; Nascimento, K. S. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 134, 901–911.

- (12) Santos, V. F.; Araujo, A. C. J.; Freitas, P. R.; Silva, A. L. P.; Santos, A. L. E.; Matias da Rocha, B. A.; Silva, R. R. S.; Almeida, D. V.; Garcia, W.; Coutinho, H. D. M.; Teixeira, C. S. Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multidrug-resistant strains when complexed with *Canavalia ensiformis* lectin. *Microb. Pathog.* 2021, 152, 104639.
- (13) Roma, R. R.; Oliveira, F. S. A.; Fernandes, D. G. S.; Garcia, W.; Soares, E. N.; Costa, S. L.; Teixeira, C. S. ConA-glutamate interactions: New insights into its neuroprotective effect. *Int. J. Biol. Macromol.* 2025, 310 (Pt 3), 143463.
- (14) Santos, A. L. E. D.; Souza, R. O. S.; Barbosa, F. E. V.; Santos, M. H. C. D.; Grangeiro, Y. A.; Martins, A. M. C.; Santos-Gomes, G.; Fonseca, I. P. D.; Silva, C. G. L. D.; Teixeira, C. S. Concanavalin A, lectin from *Canavalia ensiformis* seeds has *Leishmania infantum* antipromastigote activity mediated by carbohydrate recognition domain. *Chem. Biol. Interact.* 2024, 399, 111156.
- (15) Fonseca, V. J. A.; Braga, A. L.; de Almeida, R. S.; da Silva, T. G.; da Silva, J. C. P.; de Lima, L. F.; Dos Santos, M. H. C.; Dos Santos Silva, R. R.; Teixeira, C. S.; Coutinho, H. D. M.; Morais-Braga, M. F. B. Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* 2022, 204 (6), 346.
- (16) Vale de Macedo, G. H. R.; Chagas, V. L.; Cruz dos Santos, M. H.; Costa dos Santos, G. D.; Bazán, J. M. N.; Zigmignan, A.; Carvalho, E. M.; Mendonça de Miranda, R. d. C.; Teixeira, C. S.; Nascimento da Silva, L. C. Development and Characterization of Alginate-Derived Crosslinked Hydrogel Membranes Incorporated with ConA and Gentamicin for Wound Dressing Applications. *Biochem. Eng. J.* 2022, 187, 108664.
- (17) de Melo Bisneto, A. V.; de Paiva, F. E. A.; Fernandes, A. S.; Roma, R. R.; Silva, L. S.; Chiesi, G. V.; Franchi, L. P.; Cardoso, C. G.; Teixeira, C. S.; Chen-Chen, L. *Dioclea violacea* lectin exerts proangiogenic effects by increasing VEGF and TNF- $\alpha$  levels via carbohydrate recognition domain. *Cytokine* 2025, 192, 156966.
- (18) Vêras, J. H.; Cardoso, C. G.; Puga, S. C.; de Melo Bisneto, A. V.; Roma, R. R.; Santos Silva, R. R.; Teixeira, C. S.; Chen-Chen, L. Lactose-Binding Lectin from *Vaitarea macrocarpa* Seeds Induces In Vivo Angiogenesis via VEGF and TNF- $\alpha$  Expression and Modulates In Vitro Doxorubicin-Induced Genotoxicity. *Biochimie* 2022, 194, 55–66.

- (19) Li, J.-Z.; Zhou, X.-X.; Wu, W.-Y.; Qiang, H.-F.; Xiao, G.-S.; Wang, Y.; Li, G. Concanavalin A Promotes Angiogenesis and Proliferation in Endothelial Cells through the Akt/ERK/Cyclin D1 Axis. *Pharm. Biol.* 2022, 60, 65–7.
- (20) Ahmad, A.; Nawaz, M. I. Molecular Mechanism of VEGF and Its Role in Pathological Angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* 2022, 123, 1938–1965.
- (21) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680–685.
- (22) Auerbach, R.; Kubai, L.; Knighton, D.; Folkman, J. A. Simple Procedure for the Long-Term Cultivation of Chicken Embryos. *Dev. Biol.* 1974, 41, 391–394.
- (23) Medeiros, K. M. d.; Araujo, E. M.; Lira, H. d. L.; Lima, D. d. F.; Lima, C. A. P. d. Hybrid Membranes of Polyamide Applied in Treatment of Waste Water. *Mater. Res.* 2017, 20 (2), 308–316.
- (24) Bazán, J. M. N.; Chagas, V. L.; Silva, R. G.; Soeiro Silva, I. S.; Nantes Araujo, J. G.; Silva, L. d. S.; Batista, K. L. R.; Silva, R. R. d. S.; Correia, M. T. d. S.; Sousa, J. C. d. S.; Monteiro, C. d. A.; Tofanello, A.; Garcia, W.; et al. Development and Characterization of Alginate-Derived Bioadhesive Films Incorporated with Anti-Infective Lectins for Application in the Treatment of Oral Candidiasis. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023, 90, 105114.
- (25) Pavlovcič, U.; Diaci, J.; Mozina, J.; Jezersek, M. Wound Perimeter, Area, and Volume Measurement Based on Laser 3D and Color Acquisition. *Biomed. Eng. Online* 2015, 14, 39.
- (26) Rouwkema, J.; Rivron, N. C.; van Blitterswijk, C. A. Vascularization in Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 434–441.
- (27) Nakipoglu, M.; Tezcaner, A.; Contag, C. H.; Annabi, N.; Ashammakhi, N. Bioadhesives with Antimicrobial Properties. *Adv. Mater.* 2023, 35, 2300840.
- (28) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 2892–2923.
- (29) Rizky, S.; Budhijanto; Wintoko, J. Modification of Bioadhesive Based on Crosslinked Alginate and Gelatin. *Mater. Today Proc.* 2023.

- (30) Zhang, Z.; Li, W.; Liu, Y.; Yang, Z.; Ma, L.; Zhuang, H.; Wang, E.; Wu, C.; Huan, Z.; Guo, F.; et al. Design of a Biofluid-Absorbing Bioactive Sandwich-Structured Zn–Si Bioceramic Composite Wound Dressing for Hair Follicle Regeneration and Skin Burn Wound Healing. *Bioact. Mater.* 2021, 6, 1910–1920.
- (31) Rehman, S. R.; Augustine, R.; Zahid, A. A.; Ahmed, R.; Tariq, M.; Hasan, A. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 9603–9617.
- (32) Nuutila, K.; Eriksson, E. Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings. *Adv. Wound Care* 2021, 10, 685– 698.
- (33) Senturk Parreidt, T.; Müller, K.; Schmid, M. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods* 2018, 7, 170.
- (34) Jones, V.; Grey, J. E.; Harding, K. G. Wound Dressings. *BMJ* 2006, 332, 777–780.
- (35) Gontijo, J. F.; Bierhalz, A. C. K. Membranas de Alginato E Para Liberação de Farmaco: Efeito Da Proporção Polimérica; Blucher: São Paulo, 2018, p 3040.
- (36) Reguera, J.; Urry, D. W.; Parker, T. M.; McPherson, D. T.; Rodríguez-Cabello, J. C. Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer. *Biomacromolecules* 2007, 8, 354–358.
- (37) Medeiros, K. M. d.; Araujo, E. M.; Lira, H. d. L.; Lima, D. d. F.; Lima, C. A. P. d. Hybrid Membranes of Polyamide Applied in Treatment of Waste Water. *Mater. Res.* 2017, 20, 308–316.
- (38) de Melo Bisneto, A. V.; Fernandes, A. S.; Velozo Sá, V. d. S.; Vêras, J. H.; Soares, E. T. S.; da Silva Santos, A. F.; Cardoso, C. G.; Silveira-Lacerda, E. d. P.; Carneiro, C. C.; Chen-Chen, L. AntiAngiogenic Activity of Azathioprine. *Microvasc. Res.* 2021, 138, 104234.
- (39) Salama, H. E.; Abdel Aziz, M. S.; Alsehli, M. Carboxymethyl Cellulose/Sodium Alginate/Chitosan Biguanidine Hydrochloride Ternary System for Edible Coatings. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 139, 614–620.
- (40) Mahheidari, N.; Kamalabadi-Farahani, M.; Nourani, M. R.; Atashi, A.; Alizadeh, M.; Aldaghi, N.; Salehi, M. Biological Study of Skin Wound Treated with Alginate/Carboxymethyl

Cellulose/ Chorion Membrane, Diopside Nanoparticles, and Botox A. *NPJ Regen. Med.* 2024, 9, 9.

(41) Fajardo, A. R.; Silva, M. B.; Lopes, L. C.; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Hydrogel Based on an Alginate–Ca<sup>2+</sup>/Chondroitin Sulfate Matrix as a Potential Colon-Specific Drug Delivery System. *RSC Adv.* 2012, 2, 11095.

(42) da Silva Fernandes, R.; de Moura, M. R.; Glenn, G. M.; Aouada, F. A. Thermal, Microstructural, and Spectroscopic Analysis of Ca<sup>2+</sup> Alginate/Clay Nanocomposite Hydrogel Beads. *J. Mol. Liq.* 2018, 265, 327–336.

(43) Todica, M.; Stefan, R.; Pop, C. V.; Olar, L. IR and Raman Investigation of Some Poly(Acrylic) Acid Gels in Aqueous and Neutralized State. *Acta Phys. Pol., A* 2015, 128, 128–135.

(44) Luo, S.; Lu, T.; Peng, L.; Shao, J.; Zeng, Q.; Gu, J.-D. Synthesis of Nanoscale Zero-Valent Iron Immobilized in Alginate Microcapsules for Removal of Pb(ii) from Aqueous Solution. *J. Mater. Chem. A* 2014, 2, 15463.

(45) Novosel, E. C.; Kleinhans, C.; Kluger, P. J. Vascularization Is the Key Challenge in Tissue Engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2011, 63, 300–311.

(46) Zilla, P.; Bezuidenhout, D.; Human, P. Prosthetic Vascular Grafts: Wrong Models, Wrong Questions and No Healing. *Biomaterials* 2007, 28, 5009–5027.

(47) Kamoun, E. A.; Kenawy, E.-R. S.; Tamer, T. M.; El-Meligy, M. A.; Mohy Eldin, M. S. Poly (Vinyl Alcohol)-Alginate Physically Crosslinked Hydrogel Membranes for Wound Dressing Applications: Characterization and Bio-Evaluation. *Arab. J. Chem.* 2015, 8, 38–47.

(48) Recum, A. F. V.; Shannon, C. E.; Cannon, C. E.; Long, K. J.; Kooten, T. G. V.; Meyle, J. Surface Roughness, Porosity, and Texture as Modifiers of Cellular Adhesion. *Tissue Eng.* 1996, 2, 241–253.

(49) Milleret, V.; Hefti, T.; Hall, H.; Vogel, V.; Eberli, D. Influence of the Fiber Diameter and Surface Roughness of Electrospun Vascular Grafts on Blood Activation. *Acta Biomater.* 2012, 8, 4349–4356.

(50) Boehringer, J. R.; Karpowicz, J.; Mitra, A.; Radl, C. L. Growth stimulating wound dressing with improved contact surfaces. U.S. Patent 7,951,124 B2, 2011.

(51) Azarpira, N.; Kaviani, M.; Sarvestani, F. S. Incorporation of VEGF-and BFGF-Loaded Alginate Oxide Particles in Acellular Collagen-Alginate Composite Hydrogel to Promote Angiogenesis. *Tissue Cell* 2021, 72, 101539.

(52) Shen, Y.; Wang, X.; Wang, Y.; Guo, X.; Yu, K.; Dong, K.; Guo, Y.; Cai, C.; Li, B. Bilayer Silk Fibroin/Sodium Alginate Scaffold Promotes Vascularization and Advances Inflammation Stage in FullThickness Wound. *Biofabrication* 2022, 14, 035016.

## REFERÊNCIAS

ABKA-KHAJOUEI, Roya; TOUNSI, Latifa; SHAHABI, Nasim; PATEL, Anil Kumar; ABDELKAFI, Slim; MICHAUD, Philippe. Structures, Properties and Applications of Alginates. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 364, 2022. b. DOI: 10.3390/md20060364.

AKALIN, Gulen Oytun; PULAT, Mehlika. Controlled release behavior of zinc-loaded carboxymethyl cellulose and carrageenan hydrogels and their effects on wheatgrass growth. **Journal of Polymer Research**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 6, 2020. DOI: 10.1007/s10965-019-1950-y.

ANNESE, Tiziana; TAMMA, Roberto; RIBATTI, Domenico. IKOSA® CAM Assay Application to Quantify Blood Vessels on Chick Chorioallantoic Membrane (CAM). *Em*: [s. l.: s. n.]. p. 129–139. DOI: 10.1007/978-1-0716-2703-7\_10.

ARAVAMUDHAN, Aja; RAMOS, Dasisy M.; NADA, Ahmed A.; KUMBAR, Sangamesh G. Natural Polymers. *In: Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, [s. l.], 2014. p. 67–89. DOI: 10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1.

ÁVILA-GÁLVEZ, María Ángeles; VICO-PADILLA, Antonio; SCHNEIDER, Claus; ESPÍN, Juan Carlos; GONZÁLEZ-SARRÍAS, Antonio; GIMÉNEZ-BASTIDA, Juan Antonio. Angiogenesis as a Therapeutic Target of (Poly)phenols: Tackling Cancer and Vascular-Related Complications. **Mol Nutr Food Res**, [s. l.], v. 69, n. 15, p. 70110, 2025. DOI: 10.1002/mnfr.70110.

AXPE, Eneko; OYEN, Michelle. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *In: International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 17, n° 12, p. 1976, 2016. ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms17121976.

BAI, Xiuping et al. Self-cross-linkable hydrogels composed of partially oxidized alginate and gelatin for myocardial infarction repair. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 126–140, 2013. DOI: 10.1177/0883911512473230.

BARBIERI, Luigi; BATTELLI, Maria Giulia; STIRPE, Fiorenzo. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, [s. l.], v. 1154, n. 3–4, p. 237–282, 1993. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90002-6.

BARROS ALMEIDA, Isabella; GARCEZ BARRETTO TEIXEIRA, Luciana; OLIVEIRA DE CARVALHO, Fernanda; RAMOS SILVA, Érika; SANTOS NUNES, Paula; VIANA DOS SANTOS, Márcio Roberto; ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO, Adriano. Smart Dressings for Wound Healing: A Review. *In: Advances in Skin & Wound Care*, [s. l.], v. 34, n° 2, p. 1–8, 2021. ISSN: 1538-8654, DOI: 10.1097/01.ASW.0000725188.95109.68.

BECKER, J. W.; REEKE JR. G. N.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 250, n. 4, p.1513-24, 1975.

BECKER, J. W.; REEKE, G. N.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A. **Nature**, [s. l.], v. 259, n. 5542, p. 406–409, 1976. DOI: 10.1038/259406a0.

BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J.; YARMUSH, Martin L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *In: Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, [s. l.], v. 2, n° 1, p. 403–430, 2011. ISSN: 1947-5438, DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.

BEZENAH, J. R., KONG, Y. P., PUTNAM, A. J. Evaluating the potential of endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells to form microvascular networks in 3D cultures. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 2671, 2018.

BIAN, Z.; WANG, Q.; ZHOU, X.; TAN, T.; PARK, K. H.; KRAMER, H. F.; MCDUGAL, A.; LAPING, N. J.; KUMAR, S.; ADESANYA, T. M. A.; SERMERSHEIM, M.; YI, F.; WANG, X.; WU, J.; GUMPPER, K.; JIANG, Q.; HE, D.; LIN, P. H.; LI, H.; GUAN, F.; ZHOU, J.; KOHR, M. J.; ZENG, C.; ZHU, H.; MA, J. Sustained elevation of MG53 in the bloodstream increases tissue regenerative capacity without compromising metabolic function. *Nature Communications*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 4659, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-12483-0.

BONANINI, F., KUREK, D., PREVIDI, S., NICOLAS, A., HENDRIKS, D., DE RUITER, S., MEYER, M., CLAPÉS CABRER, M., DINKELBERG, R., GARCÍA, S. B., KRAMER, B., OLIVIER, T., HU, H., LÓPEZ-IGLESIAS, C., SCHAVEMAKER, F., WALINGA, E., DUTTA, D., QUEIROZ, K., DOMANSKY, K.; RONDEN, B.; JOORE, J.; LANZ, H. L.; PEDROS, P. J.; TRIETSCH, S. J.; CLEVERS, H.; VULTO, P. *In vitro* grafting of hepatic spheroids and organoids on a microfluidic vascular bed. *Angiogenesis*, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 455–470, 2022. DOI: 10.1007/s10456-022-09842-9.

BROWN, Alexander; HE, Hongkun; TRUMPER, Ella; VALDEZ, Jorge; HAMMOND, Paula; GRIFFITH, Linda G. Engineering PEG-based hydrogels to foster efficient endothelial network formation in free-swelling and confined microenvironments. *Biomaterials*, [s. l.], v. 243, p. 119921, 2020. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119921.

CAO, Renhai; BRÅKENHJELM, Ebba; PAWLIUK, Robert; WARIARO, David; POST, Mark J.; WAHLBERG, Eric; LÉBOULCH, Philippe; CAO, Yihai. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nature Medicine*, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 604–613, 2004. DOI: 10.1038/nm848.

CARMELIET, Peter; JAIN, Rakesh K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, [s. l.], v. 473, n. 7347, p. 298–307, 2011. DOI: 10.1038/nature10144.

CAVADA, B.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein & Peptide Science*, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001. DOI: 10.2174/1389203013381152.

CAVADA, Benildo S.; PINTO-JUNIOR, Vanir R.; OSTERNE, Vinicius J. S.; NASCIMENTO, Kyria S. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 30, 2018. DOI: 10.3390/ijms20010030.

CAVADA, Benildo Sousa; OSTERNE, Vinicius Jose Silva; LOSSIO, Claudia Figueiredo; PINTO-JUNIOR, Vanir Reis; OLIVEIRA, Messias Vital; SILVA, Mayara Torquato Lima; LEAL, Rodrigo Bainy; NASCIMENTO, Kyria Santiago. One century of ConA and 40 years

of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 134, p. 901–911, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100.

CHEN Y.; ZHANG Z.; YANG X.; LIU A.; LIU S.; FENG J.; XUAN, K. Odontogenic MSC heterogeneity: Challenges and opportunities for regenerative medicine. **Front. Physiol**, [s. l.], v. 13, n. 827470, 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.827470.

CHEN, G.; HOU, Z.; GULBRANSON, D. R.; THOMSON, J. A. Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 240-248, 2010. DOI 10.1016/j.stem.2010.06.017.

CHEN, X.; WU, H.; CHEN, H.; WANG, Q.; XIE, X. JIAO.; SHEN, J. Astragaloside VI Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Enhances Neurological Function Recovery in Transient Cerebral Ischemic Injury via Activating EGFR/MAPK Signaling Cascades. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 3053–3067, 2019. DOI: 10.1007/s12035-018-1294-3.

CLARK, D.; MAO, L. Cancer biomarker discovery: Lectin-based strategies targeting glycoproteins. **Disease Markers**, [s. l.], v. 33, n. 1, 1–10, 2012. DOI: 10.3233/dma-2012-0904.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. **Plant chitinases**. *Plant Journal*, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 31–40, 1993. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1993.t01-1-00999.x.

COSTA, Nubya Nascimento; FARIA LOPES, Lohanna DE; FERREIRA, Daiana Freitas; PRADO, Elisabeth Maria López DE; SEVERI, Juliana Aparecida; RESENDE, Juliana Alves; PAULA CARETA, Francisco DE; FERREIRA, Maria Carolina Pimentel; CARREIRA, Lilian Gasparelli; SOUZA, Sarah Oliveira Lamas DE; COTRIM, Monique Alvarenga Pinto; BOEING, Thaise; ANDRADE, Sérgio Faloni DE; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; VILLANOVA, Janaina Cecília Oliveira. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. *In: Materials Science and Engineering: C*, [s. l.], v. 109, p. 110643, 2020. ISSN: 09284931, DOI: 10.1016/j.msec.2020.110643.

CROSBY, Cody O.; VALLIAPPAN, Deepti; SHU, David; KUMAR, Sachin; TU, Chengyi; DENG, Wei; PAREKH, Sapun H.; ZOLDAN, Janet. Interpenetrating polymer network hydrogels as bioactive scaffolds for tissue engineering. **Reviews in Chemical Engineering**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 347, 2020. DOI: 10.1515/revce-2020-0039.

CRUZ, A. G.; LEÓN-LÓPEZ, A.; CRUZ-GÓMEZ, V.; JIMÉNEZ-ALVARADO, R.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, G. Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 181, 2020. DOI: 10.3390/antiox9020181.

CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 250, p.1503–1512, 1975. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41841-3.

DARISTOTLE, John L.; LAU, Lung W.; ERDI, Metecan; HUNTER, Joseph; DJOUM, Albert; SRINIVASAN, Priya; WU, Xiaofang; BASU, Mousumi; AYYUB, Omar B.;

- SANDLER, Anthony D.; KOFINAS, Peter. Sprayable and biodegradable, intrinsically adhesive wound dressing with antimicrobial properties. *In: Bioengineering & Translational Medicine*, [s. l.], v. 5, n° 1, 2020. ISSN: 2380-6761, DOI: 10.1002/btm2.10149.
- DAS, Subhamoy; BAKER, Aaron B. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. *In: Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [s. l.], v. 4, 2016. ISSN: 2296-4185, DOI: 10.3389/fbioe.2016.00082.
- DAVOODI, S; AL-SHARGABI, M; WOOD, D. A; RUKAVISHNIKOV, V. S; MINAEV, K. M. Synthetic polymers: A review of applications in drilling fluids. *Petroleum Science*, [s. l.], v. 21 n. 1, p. 475-518, 2024. DOI: 10.1016/j.petsci.2023.08.015.
- DEANFIELD, John E.; HALCOX, Julian P.; RABELINK, Ton J. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*, [s. l.], v. 115, n. 10, p. 1285–1295, 2007. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.
- DODERO, Andrea; ALLOISIO, Marina; VICINI, Silvia; CASTELLANO, Maila. Preparation of composite alginate-based electrospun membranes loaded with ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 227, p. 115371, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115371.
- DODERO, Andrea; WILLIAMS, Rhodri; GAGLIARDI, Simona; VICINI, Silvia; ALLOISIO, Marina; CASTELLANO, Maila. Characterization of Hyaluronic Acid by Dynamic Light Scattering and Rheological Techniques. *AIP Conf. Proc.*, [s. l.], v. 1981, n. 020184, 2018. DOI: 10.1063/1.5046046.
- DOEBELE, C.; BONAUER, A.; FISCHER, A.; SCHOLZ, A.; REISS, Y.; URBICH, C.; HOFMANN, W. K.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*, [s. l.], v. 115, n. 23, p. 4944–4950, 2010. DOI: 10.1182/blood-2010-01-264812.
- DONG, Ruonan; GUO, Baolin. Smart wound dressings for wound healing. *In: Nano Today*, [s. l.], v. 41, p. 101290, 2021. DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101290.
- DUDLEY, Andrew C.; GRIFFIOEN, Arjan W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 313–347, 2023. DOI: 10.1007/s10456-023-09876-7.
- DVORAK, H.F. Tumors Wounds that Do Not Heal, Similarities between Tumor Stroma Generation and Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, [s. l.], v. 315, p. 1650-1659, 1986. DOI: 10.1056/nejm198612253152606.
- ELLERMANN, Else; MEYER, Nima; CAMERON, Ruth E.; BEST, Serena M. *In vitro* angiogenesis in response to biomaterial properties for bone tissue engineering: a review of the state of the art. *Regenerative Biomaterials*, [s. l.], v. 10, 2023. DOI: 10.1093/rb/rbad027.
- FADINI, Gian Paolo; ALBIERO, Mattia; BONORA, Benedetta Maria; AVOGARRO, Angelo. Angiogenic Abnormalities in Diabetes Mellitus: Mechanistic and Clinical Aspects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, [s. l.], v. 104, n. 11, p. 5431–5444, 2019. DOI: 10.1210/jc.2019-00980.

FERNANDO, Ilekuttige Priyan Shanura; LEE, WonWoo; HAN, Eui Jeong; AHN, Ginnae. Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *In: Chemical Engineering Journal*, [s. l.], v. 391, p. 123823, 2020. DOI: 10.1016/j.cej.2019.123823.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, [s. l.], n. 285, v. 21, p. 1182-1186, 1971. DOI: 10.1056/nejm197111182852108.

FOLKMAN, Judah. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 27–30, 1995. DOI: 10.1038/nm0195-27.

GARRETA, E.; MOYA-RULL, D.; MARCO, A.; AMATO, G.; ULLATE-AGOTE, A.; TARANTINO, C.; GALLO, M.; ESPORRÍN-UBIETO, D.; CENTENO, A.; VILAS-ZORNOZA, A.; MESTRE, R.; KALIL, M.; GORROÑOGOITIA, I.; ZALDUA, A. M.; SANCHEZ, S.; IZQUIERDO REYES, L.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. E.; PROSPER, F.; MONTSERRAT, N. Natural Hydrogels Support Kidney Organoid Generation and Promote In Vitro Angiogenesis. *Advanced Materials*, [s. l.], v. 36, n. 34, 2024. DOI: 10.1002/adma.202400306.

GOUTAGNY, Nadège; ESTORNES, Yann; HASAN, Uzma; LEBECQUE, Serge; CAUX, Christophe. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Targeted Oncology*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 29–54, 2013. DOI: 10.1007/s11523-012-0213-1.

GREER, J.; KAUFMAN, H. W.; KALB, A. Joseph. An X-ray crystallographic study of concanavalin A. *Journal of Molecular Biology*, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 365–366, 1970. DOI: 10.1016/0022-2836(70)90169-5.

GROTE, Karsten; SCHÜTT, Harald; SCHIEFFER, Bernhard. Toll-Like Receptors in Angiogenesis. *The Scientific World JOURNAL*, [s. l.], v. 11, p. 981–991, 2011. DOI: 10.1100/tsw.2011.92.

HAN, Jingxuan; LUO, Lailiu; MARCELINA, Olivia; KASIM, Vivi; WU, Shourong. Therapeutic angiogenesis-based strategy for peripheral artery disease. *Theranostics*, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 5015–5033, 2022. DOI: 10.7150/thno.74785.

HANAHAN, Douglas; FOLKMAN, Judah. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 353–364, 1996. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.

HARDMAN, Karl D.; AINSWORTH, Clinton F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry*, [s. l.], v. 11, n. 26, p. 4910–4919, 1972. a. DOI: 10.1021/bi00776a006.

HAY, Iain D.; REHMAN, Zahid Ur; MORADALI, M. Fata; WANG, Yajie; REHM, Bernd H. A. Microbial alginate production, modification and its applications. *In: Microbial Biotechnology*, [s. l.], v. 6, n° 6, p. 637–650, 2013. DOI: 10.1111/1751-7915.12076.

HESSELER, Michael J.; SHYAM, Nikhil. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: A systematic review. *In: Journal of the American Academy of Dermatology*, [s. l.], v. 81, n° 3, p. 834–846, 2019. DOI: 10.1016/j.jaad.2019.04.037.

- HOSSEINI, Seyed Mohammad Reza; HEYDARI, Parisa; NAMNABAT, Mahtab; NASR AZADANI, Reyhaneh; AZIMI GHARIBDOUSTI, Fateme; MOUSAVI RIZI, Elmira; KHOSRAVI, Arezoo; ZAREPOUR, Atefeh; ZARRABI, Ali. Carboxymethyl cellulose/sodium alginate hydrogel with anti-inflammatory capabilities for accelerated wound healing; In vitro and in vivo study. *In: European Journal of Pharmacology*, [s. l.], v. 976, p. 176671, 2024. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176671.
- HULDANI, H.; RASHID, A. I.; TURAEV, K. N.; OPULENCIA, M. J. C.; ABDELBASSET, W. K.; BOKOV, D. O.; MUSTAFA, Y. F.; AL-GAZALLY, M. E.; HAMMID, A. T.; KADHIM, M. M.; AHMADI, S. H. Concanavalin A as a promising lectin-based anti-cancer agent: the molecular mechanisms and therapeutic potential. **Cell Communication and Signaling**. [s. l.], v. 20, n. 1, p.167, 2022. DOI: 10.1186/s12964-022-00972-7.
- INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 8, n. 12, Article ID e26595, 2013. DOI: 10.4161/psb.26595.
- JACK, A., WEINZIERL, J., KALB, A. J. An X-ray crystallographic study of demetallized concanavalin A. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 58, p. 389–395, 1971. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90254-3.
- JOYCE, Kieran; FABRA, Georgina Targa; BOZKURT, Yagmur; PANDIT, Abhay. Bioactive potential of natural biomaterials: identification, retention and assessment of biological properties. *In: Signal Transduction and Targeted Therapy*, [s. l.], v. 6, n° 1, p. 122, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00512-8.
- KALIA, Susheel; AVÉROUS, Luc. Biopolymers. [s. l.] : **Wiley**, 2011. DOI: 10.1002/9781118164792.
- KALOGERIS, Teodoro; BAINES, Christopher P.; KRENZ, Maïke; KORTHUIS, Ronald J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. **Int Rev Cell Mol Biol**, [s. l.], n. 298, p. 229-317, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.
- KANIKIREDDY, Vimala; VARAPRASAD, Kokkarachedu; JAYARAMUDU, Tippabattini; KARTHIKEYAN, Chandrasekaran; SADIKU, Rotimi. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 164, p. 963–975, 2020. ISSN: 01418130, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.160.
- KOCH, S.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 2, n. 7, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a006502.
- LAM, S, K.; Ng, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 89, p. 45-55, 2010. DOI: 10.1007/s00253-010-2892-9.
- LANE, Steven W.; WILLIAMS, David A.; WATT, Fiona M. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 795–803, 2014. a. DOI: 10.1038/nbt.2978.
- LEENE, W.; DUYZINGS, M. J. M.; VAN STEEG, C. Lymphoid stem cell identification in the developing thymus and bursa of fabricius of the chick. **Zeitschrift Für Zellforschung**

**Und Mikroskopische Anatomie**, [s. l.], v. 136, n. 4, p. 521–533, 1973. DOI: 10.1007/BF00307368.

LEI, Huan-Yao; CHANG, Chih-Peng. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 10, 2009. DOI: 10.1186/1423-0127-16-10.

LESLIE-BARBICK, Julia E.; SAIK, Jennifer E.; GOULD, Daniel J.; DICKINSON, Mary E.; WEST, Jennifer L. The promotion of microvasculature formation in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels by an immobilized VEGF-mimetic peptide. **Biomaterials**, [s. l.], v. 32, n. 25, p. 5782–5789, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.060.

LI, Jingjing; LI, Renkai; WU, Xiaoping; ZHENG, Chengwen; SHIU, Polly Ho-Ting; RANGSINTH, Panthakarn; LEE, Simon Ming-Yuen; LEUNG, George Pak-Heng. An Update on the Potential Application of Herbal Medicine in Promoting Angiogenesis. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 13, 2022. a. DOI: 10.3389/fphar.2022.928817.

LI, Minxiong; XIA, Wenzheng; KHOONG, Yi Min; HUANG, Lujia; HUANG, Xin; LIANG, Hsin; ZHAO, Yun; MAO, Jiayi; YU, Haijun; ZAN, Tao. Smart and versatile biomaterials for cutaneous wound healing. *In: Biomaterials Research*, [s. l.], v. 27, n° 1, 2023. ISSN: 2055-7124, DOI: 10.1186/s40824-023-00426-2.

LI, Xiaoqun; FANG, Shuo; WANG, Shaohai; XIE, Yang; XIA, Yan; WANG, Panfeng; HAO, Zichen; XU, Shuogui; ZHANG, Yuntong. Hypoxia preconditioning of adipose stem cell-derived exosomes loaded in gelatin methacryloyl (GelMA) promote type H angiogenesis and osteoporotic fracture repair. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 112, 2025. DOI: 10.1186/s12951-024-02342-6.

LIU, Bin; GU, Xinquan; SUN, Qiannan; JIANG, Shengjie; SUN, Jing; LIU, Kai; WANG, Fan; WEI, Yan. Injectable In Situ Induced Robust Hydrogel for Photothermal Therapy and Bone Fracture Repair. *In: Advanced Functional Materials*, [s. l.], v. 31, n° 19, 2021. ISSN: 1616-301X, DOI: 10.1002/adfm.202010779.

LIU, Wenying; THOMOPOULOS, Stavros; XIA, Younan. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 10–25, 2021. DOI: 10.1002/adhm.201100021.

LORIS, Remy. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1572, n. 2–3, p. 198–208, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00309-4.

LORIS, Remy; HAMELRYCK, Thomas; BOUCKAERT, Julie; WYNS, Lode. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998. DOI: 10.1016/S0167-4838(97)00182-9.

MAHAPATRA, Chinmaya; KUMAR, Praseon; PAUL, Manash K.; KUMAR, Awanish. Angiogenic stimulation strategies in bone tissue regeneration. **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 79, p. 101908, 2022. a. DOI: 10.1016/j.tice.2022.101908..

MASTRULLO, Valeria; CATHERY, William; VELLIUO, Eirini; MADEDDU, Paolo; CAMPAGNOLO, Paola. Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended?

**Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, 2020. a. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00188.

MIRKHALAF, Mohammad; MEN, Yinghui; WANG, Rui; NO, Young; ZREIQAT, Hala. Personalized 3D printed bone scaffolds: A review. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 156, p. 110–124, 2023. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.04.014.

MOHAMED, S. A. A.; EL-SAKHAWY, M.; EL-SAKHAWY, M. A. M. Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 238, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116178.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 3941–3994, 2011. DOI: 10.1039/c0cs00108.

MOROZKINA, Svetlana; STREKALOVSKAYA, Ulyana; VANINA, Anna; SNETKOV, Petr; KRASICHKOV, Alexander; POLYAKOVA, Victoriya; USPENSKAYA, Mayya. The Fabrication of Alginate–Carboxymethyl Cellulose–Based Composites and Drug Release Profiles. *In: Polymers*, [s. l.], v. 14, n. 17, p. 3604, 2022. DOI: 10.3390/polym14173604.

MOSHAYEDI, Pouria; NIH, Lina R.; LLORENTE, Irene L.; BERG, Andrew R.; CINKORNPUMIN, Jessica; LOWRY, William E.; SEGURA, Tatiana; CARMICHAEL, S. Thomas. Systematic optimization of an engineered hydrogel allows for selective control of human neural stem cell survival and differentiation after transplantation in the stroke brain. **Biomaterials**, [s. l.], v. 105, p. 145–155, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.028.

MUSTAFA, Muhammad Abid; RASSHED, Namra; ANSAR, Seerat; ZAHID, Qadeer; ARSHAD, Sadia; YOUSRA; NAZ, Samia; JAVED, Sana; SHAH, Syed Hammad Ali; SEHRISH; IMRAN, Fatima; ARIF, Minahil; IQBAL, Muhammad Zahid. Green Fabrication Approach to Hydrogel Synthesis by Using Natural Polymers, their Characterization, and Applications. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 195, 2024.

NAISMITH, J. H.; EMMERICH, C.; HABASH, J.; HARROP, S. J.; HELLIWELL, J. R.; HUNTER, W. N.; RAFTERY, J.; KALB, A. J.; YARIV, J. Refined structure of concanavalin A complexed with methyl alpha-D-mannopyranoside at 2.0 Angstroms resolution and comparison with the saccharide-free structure. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 847–858, 1994. DOI: 10.1107/S0907444994005287.

NGO, M. T.; HARLEY, B. A. C. Angiogenic biomaterials to promote therapeutic regeneration and investigate disease progression. **Biomaterials**, [s. l.], v. 255, p. 120207, 2020. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120207.

NOWAK-SLIWINSKA, P., ALITALO, K., ALLEN, E., ANISIMOV, A., APLIN, A. C., AUERBACH, R., AUGUSTIN, H. G., BATES, D. O., VAN BEIJNUM, J. R., HUGH BENDER, R. F., BERGERS, G., BIKFALVI, A., BISCHOFF, J., BÖCK, B. C., BROOKS, P. C., BUSSOLINO, F., CAKIR, B., CARMELIET, P.; CASTRANOVA, D.; CIMPEAN, A. M.; CLEAVER, O.; COUKOS, G.; DAVIS, G. E.; DE PALMA, M.; DIMBERG, A.; DINGS, R. P. M.; DJONOV, V.; DUDLEY, A. C.; DUFTON, N. P.; FENDT, S. M.; FERRARA, N.; FRUTTIGER, M.; FUKUMURA, D.; GHESQUIÈRE, B.; GONG, Y.; GRIFFIN, R. J.; HARRIS, A. L.; HUGHES, C. C. W.; HULTGREN, N. W.;

IRUELA-ARISPE, M. L.; IRVING, M.; JAIN, R. K.; KALLURI, R.; KALUCKA, J.; KERBEL, R. S.; KITAJEWSKI, J.; KLAASSEN, I.; KLEINMANN, H. K.; KOOLWIJK, P.; KUCZYNSKI, E.; KWAK, B. R.; MARIEN, K.; MELERO-MARTIN, J. M.; MUNN, L. L.; NICOSIA, R. F.; NOEL, A.; NURRO, J.; OLSSON, A. K.; PETROVA, T. V.; PIETRAS, K.; PILI, R.; POLLARD, J. W.; POST, M. J.; QUAX, P. H. A.; RABINOVICH, G. A.; RAICA, A.; RANDI, A. M.; RIBATTI, D.; RUEGG, C.; SCHLINGEMANN, R. O.; SCHULTE-MERKER, S.; SMITH, L. E. H.; SONG, J. W.; STACKER, S. A.; STALIN, J.; STRATMAN, A. N.; DE VELDE, M. V.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; VERMEULEN, P. B. WALTENBERGER, J.; WEINSTEIN, B. M.; XIN, H., YETKIN-ARIK, B., YLA-HERTTUALA, S.; YODER, M. C.; STACKER, S. A.; STALIN, J.; GRIFFIOEN, A. W. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. **Angiogenesis**, [s. l.], n. 19, v. 67, p. 68, 2018. DOI: 10.1007/s10456-018-9613-x.

OLIVEIRA, Cristiana; SOUSA, Diana; TEIXEIRA, José A.; FERREIRA-SANTOS, Pedro; BOTELHO, Claudia M. Polymeric biomaterials for wound healing. *In: Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [s. l.], v. 11, 2023. ISSN: 2296-4185, DOI: 10.3389/fbioe.2023.1136077.

OSTERNE, V. J. S.; SILVA-FILHO, J. C.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; ALMEIDA, A. C.; BARRETO, A. A. G. C.; WOLIN, I. A. V.; NASCIMENTO, A. P. M.; AMORIM, R. M. F.; ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; LEAL, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 94, (Pt A), p. 271–282, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.020.

PANDE, Reena L.; HIATT, William R.; ZHANG, Peter; HITTEL, Norbert; CREAGER, Mark A. A pooled analysis of the durability and predictors of treatment response of cilostazol in patients with intermittent claudication. **Vascular Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 181–188, 2010. DOI: 10.1177/1358863X10361545.

PAQUES, Jerome P.; LINDEN, Erik VAN DER; RIJN, Cees J.M. VAN; SAGIS, Leonard M.C. Preparation methods of alginate nanoparticles. *In: Advances in Colloid and Interface Science*, [s. l.], v. 209, p. 163–171, 2014. ISSN: 00018686, DOI: 10.1016/j.cis.2014.03.009.

PARKIN, S.; RUPP, B.; HOPE, H. Atomic resolution structure of concanavalin A at 120 K. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1161–1168, 1996. DOI: 10.1107/S09074444996009237.

PATEL, Dinesh K.; DUTTA, Sayan Deb; GANGULY, Keya; LIM, Ki-Taek. Multifunctional bioactive chitosan/cellulose nanocrystal scaffolds eradicate bacterial growth and sustain drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 170, p. 178–188, 2021. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.145.

PAZYAR, Nader; YAGHOUBI, Reza; RAFIEE, Esmail; MEHRABIAN, Abolfath; FEILY, Amir. Skin wound healing and phytomedicine: a review. **Skin Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 303–310, 2014. DOI: 10.1159/000357477.

PEIRCE, Shayn M.; PRICE, Richard J.; SKALAK, Thomas C. Spatial and temporal control of angiogenesis and arterialization using focal applications of VEGF164 and Ang-1.

**American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 286, n. 3, p. 918–925, 2004. DOI: 10.1152/ajpheart.00833.2003.

PEUMANS, W. J.; WINTER, H. C.; BEMER, V.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I. J.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Isolation of a novel plant lectin with and unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate journal**, [s. l.], v. 14, p. 259–265, 1997. DOI: 10.1023/a:1018502107707.

PORTNOV, Tanya; SHULIMZON, Tiberiu R.; ZILBERMAN, Meital. Injectable hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *In: Reviews in Chemical Engineering*, [s. l.], v. 33, n° 1, p. 91–107, 2017. DOI: 10.1515/revce-2015-0074.

POTENTE, Michael; GERHARDT, Holger; CARMELIET, Pedro. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, [s. l.], v. 146, n. 6, p. 873–87, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.039.

PRASATHKUMAR, Murugan; SADHASIVAM, Subramaniam. Chitosan/Hyaluronic acid/Alginate and an assorted polymers loaded with honey, plant, and marine compounds for progressive wound healing—Know-how. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 186, p. 656–685, 2021. ISSN: 01418130, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.067.

PROKOPH, Silvana; CHAVAKIS, Emmanouil; LEVENTAL, Kandice R.; ZIERIS, Andrea; FREUDENBERG, Uwe; DIMMELER, Stefanie; WERNER, Carsten. Sustained delivery of SDF-1 $\alpha$  from heparin-based hydrogels to attract circulating pro-angiogenic cells. **Biomaterials**, [s. l.], v. 33, n. 19, p. 4792–4800, 2012. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.039.

RABBANY, Sina Y.; PASTORE, Joseph; YAMAMOTO, Masaya; MILLER, Tim; RAFII, Shahin; ARAS, Rahul; PENN, Marc. Continuous Delivery of Stromal Cell-Derived Factor-1 from Alginate Scaffolds Accelerates Wound Healing. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 399–408, 2010. DOI: 10.3727/096368909X481782.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. 739–744, 2001. DOI: 10.1016/s0168-9452(00)00454-4.

REEKE, G. N.; JR., BECKER, J. W.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 250, p. 1525–1547, 1975. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41843-7.

REN, Yazhen; WANG, Qiang; XU, Wanlin; YANG, Mingcheng; GUO, Wenhui; HE, Suqin; LIU, Wentao. Alginate-based hydrogels mediated biomedical applications: A review. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 279, p. 135019, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135019.

REZVANI GHOMI, Erfan; KHALILI, Shahla; NOURI KHORASANI, Saied; ESMAEELY NEISIANI, Rasoul; RAMAKRISHNA, Seeram. Wound dressings: Current advances and future directions. *In: Journal of Applied Polymer Science*, [s. l.], v. 136, n° 27, 2019. ISSN: 0021-8995, DOI: 10.1002/app.47738.

RIBATTI, Domenico. Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. **International Review of Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 270, p. 181–224, 2008. DOI: 10.1016/S1937-6448(08)01405-6.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis. **Springer nature**, [s. l.], p. 1–124, 2010. DOI: 10.1007/978-90-481-3845-6.

RICHARDSON, Thomas P.; PETERS, Martin C.; ENNETT, Alessandra B.; MOONEY, David J. Polymeric system for dual growth factor delivery. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 1029–1034, 2001. DOI: 10.1038/nbt1101-1029.

RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta anatomica**, [s. l.], v. 161, p. 130-152, 1998. DOI: 10.1159/000046454.

SAMPIETRO, A. R.; ISLĂ, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, [s. l.], v. 160, p. 659-667, 2001. DOI: 10.1016/s0168-9452(00)00442-8.

SANTOS, M. I.; UNGER, R. E.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L.; KIRKPATRICK, C. J. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone–starch scaffold and the in vitro development of vascularization. **Biomaterials**, [s. l.], v. 30, n. 26, p. 4407–4415, 2009. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.004.

SATCHANSKA, Galina; DAVIDOVA, Slavena; PETROV, Petar D. Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications. In: **Polymers**, [s. l.], v. 16, n° 8, p. 1159, 2024. ISSN: 2073-4360, DOI: 10.3390/polym16081159.

SCADDEN, David. T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, [s. l.], v. 441, n. 7097, p. 1075–1079, 2006. DOI: 10.1038/nature04957.

SCHIERLING, W.; TROIDL, K.; TROIDL, C.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SCHAPER, W.; EITENMÜLLER, I. K. The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. **Journal of Vascular Research**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 365–374, 2009. DOI: 10.1159/000189797.

SEN, Chandan K.; GORDILLO, Gayle M.; ROY, Sashwati; KIRSNER, Robert; LAMBERT, Lynn; HUNT, Thomas K.; GOTTRUP, Finn; GURTNER, Geoffrey C.; LONGAKER, Michael T. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. In: **Wound Repair and Regeneration**, [s. l.], v. 17, n° 6, p. 763–771, 2009. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x.

SESHAGIRIRAO, K.; PRASAD, M. N. Purification and partial characterization of a lectin from *Euphorbia nerifolia* latex. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1199-204, 1995.

SHANMUGAPRIYA, Karuppusamy; KIM, Hyejin; KANG, Hyun Wook. Epidermal growth factor receptor conjugated fucoidan/alginate loaded hydrogel for activating EGFR/AKT signaling pathways in colon cancer cells during targeted photodynamic therapy. In: **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 158, p. 1163–1174, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.008.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific proteins. **Science**, [s. l.], v. 177, n. 4053, 1972. DOI: 10.1126/science.177.4053.949.

SHIMIZU, S.; IBA, T.; NAITO, H.; RAHMAWATI, F. N.; KONISHI, H.; JIA, W., MURAMATSU, F.; TAKAKURA, N. Aging impairs the ability of vascular endothelial stem cells to generate endothelial cells in mice. **Angiogenesis**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 567–580, 2023. DOI: 10.1007/s10456-023-09891-8.

SINGH, Baljit; SHARMA, Sushma; DHIMAN, Abhishek. Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: Biomedical properties and histological study of wound healing. *In: International Journal of Pharmaceutics*, [s. l.], v. 457, n° 1, p. 82–91, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.09.028.

SPILLER, Kara L.; NASSIRI, Sina; WITHEREL, Claire E.; ANFANG, Rachel R.; NG, Johnathan; NAKAZAWA, Kenneth R.; YU, Tony; VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. **Biomaterials**, [s. l.], v. 37, p. 194–207, 2015. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.017.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; AND KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 407, p. 241-247, 2002. DOI: 10.1016/s0003-9861(02)00517-9.

TARUSHA, Lorena; PAOLETTI, Sergio; TRAVAN, Andrea; MARSICH, Eleonora. Alginate membranes loaded with hyaluronic acid and silver nanoparticles to foster tissue healing and to control bacterial contamination of non-healing wounds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 22, 2018. DOI: 10.1007/s10856-018-6027-7.

TOMIĆ, Simonida Lj.; BABIĆ RADIĆ, Marija M.; VUKOVIĆ, Jovana S.; FILIPOVIĆ, Vuk V.; NIKODINOVIC-RUNIC, Jasmina; VUKOMANOVIĆ, Marija. Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications. *In: Marine Drugs*, [s. l.], v. 21, n° 3, p. 177, 2023. ISSN: 1660-3397, DOI: 10.3390/md21030177.

TORRES, M. L.; FERNANDEZ, J. M.; DELLATORRE, F. G.; CORTIZO, A. M.; OBERTI, T. G. Purification of alginate improves its biocompatibility and eliminates cytotoxicity in matrix for bone tissue engineering. *In: Algal Research*, [s. l.], v. 40, p. 101499, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101499.

VALE DE MACEDO, G. H. R.; CHAGAS, V. L.; CRUZ DOS SANTOS, M. H.; COSTA DOS SANTOS, G. D.; BAZÁN, J. M. N.; ZAGMIGNAN, A.; CARVALHO, E. M.; MENDONÇA DE MIRANDA, R. D. C.; TEIXEIRA, C. S.; NASCIMENTO DA SILVA, L. C. Development and Characterization of Alginate-Derived Crosslinked Hydrogel Membranes Incorporated with ConA and Gentamicin for Wound Dressing Applications. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 187, p. 108664, 2022. DOI: 10.1016/j.bej.2022.108664.

Van DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 17, n.6, p. 575–692, 1998. DOI: 10.1080/07352689891304276.

- VAN PARIJS, Jan; BROEKAERT, Willem F.; GOLDSTEIN, Irwin J.; PEUMANS, Willy J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, [s. l.], v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991. DOI: 10.1007/BF00197797.
- VANDENBORRE, Gianni; SMAGGHE, Guy; VAN DAMME, Els J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 13, p. 1538–1550, 2011. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.02.024.
- VENKATESAN, Jayachandran; NITHYA, R.; SUDHA, Prasad N.; KIM, Se-Kwon. Role of Alginate in Bone Tissue Engineering. [s. l. s. n.], 2014. p. 45–57. DOI: 10.1016/B978-0-12-800268-1.00004-4.
- Williams TRABULSL, L. R.; SOARES, L. A. **Antibióticos Aminoglicosídeos**. Farmacologia. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- WOLOSZYK, Anna; LICCARDO, Davide; MITSIADIS, Thimios A. Three-Dimensional Imaging of the Developing Vasculature within Stem Cell-Seeded Scaffolds Cultured in ovo. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00146.
- XIAO, Xue; ZHOU, Xiaoying; MING, Huixin; ZHANG, Jinyan; HUANG, Guangwu; ZHANG, Zhe; LI, Ping. Chick Chorioallantoic Membrane Assay: A 3D Animal Model for Study of Human Nasopharyngeal Carcinoma. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0130935, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130935.
- XIMENES, N. C. A. Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da vagem *Caesalpinia ferrea* (CfePL). [s.l. s.n.], 2009.
- XUE, Xu; HU, Yan; WANG, Sicheng; CHEN, Xiao; JIANG, Yingying; SU, Jiacan. Fabrication of physical and chemical crosslinked hydrogels for bone tissue engineering. *In*: **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 12, p. 327–339, 2022. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.029.
- YAMAMOTO, Masaya; RAFII, Shahin; RABBANY, Sina Y. Scaffold biomaterials for nanopathophysiology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 74, p. 104–114, 2014. DOI: 10.1016/j.addr.2013.09.009.
- YANG, Yuanyuan; ZHANG, Chong; GONG, Ming; ZHAN, Yuan; YU, Zhenkun; SHEN, Chang; ZHANG, Yuhong; YU, Li; CHEN, Zhaoxia. Integrated photo-inspired antibacterial polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose hydrogel dressings for pH real-time monitoring and accelerated wound healing. *In*: **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 238, p. 124123, 2023. ISSN: 01418130, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124123.
- YU, Jiashing; CHRISTMAN, Karen L.; CHIN, Eric; SIEVERS, Richard E.; SAEED, Maythem; LEE, Randall J. Restoration of left ventricular geometry and improvement of left ventricular function in a rodent model of chronic ischemic cardiomyopathy. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 180–187, 2009. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2008.08.036.
- ZGHEIB, Alain; LAMY, Sylvie; ANNABI, Borhane. Epigallocatechin Gallate Targeting of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase-mediated Src and Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Signaling Inhibits Transcription of Colony-stimulating Factors 2 and 3 in Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 19, p. 13378–13386, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.456533.

ZHANG, Han; LIN, Xiang; CAO, Xinyue; WANG, Yu; WANG, Jinglin; ZHAO, Yuanjin. Developing natural polymers for skin wound healing. *In: **Bioactive Materials***, [s. l.], v. 33, p. 355–376, 2024. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.11.012.

ZHENG, Guoshuang; XUE, Chundong; CAO, Fang; HU, Minghui; LI, Maoyuan; XIE, Hui; YU, Weiting; ZHAO, Dewei. Effect of the uronic acid composition of alginate in alginate/collagen hybrid hydrogel on chondrocyte behavior. *In: **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology***, [s. l.], v. 11, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1118975.

ZHONG, Nannan; CAO, Ning; CHENG, Ziyang; FANG, Shangshang; JIANG, Minghan; GUAN, Jingyi; WANG, Wenbo; ZANG, Xiaobei. Enhanced Carboxymethyl Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressings. *In: **ACS Applied Bio Materials***, [s. l.], v. 8, n° 7, p. 5532–5546, 2025. ISSN: 2576-6422, DOI: 10.1021/acsabm.5c00815.

ZISCH, A. H.; LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. ***Cardiovasc Pathol***, [s. l.], v. 2, p. 295–310, 2003. DOI: 10.1016/s1054-8807(03)00089-9.

ZOLFAGHARIAN, Shadi; ZAHEDI, Payam; SHAFIEE ARDESTANI, Mehdi; KHATIBI, Alireza; JAFARKHANI, Saeed. Sodium alginate/xanthan-based nanocomposite hydrogels containing 5-fluorouracil: Characterization and cancer cell death studies in presence of halloysite nanotube. *In: **Journal of Industrial and Engineering Chemistry***, [s. l.], v. 120, p. 374–386, 2023. DOI: 10.1016/j.jiec.2022.12.044.

APENDICE A – DADOS SUPLEMENTARES

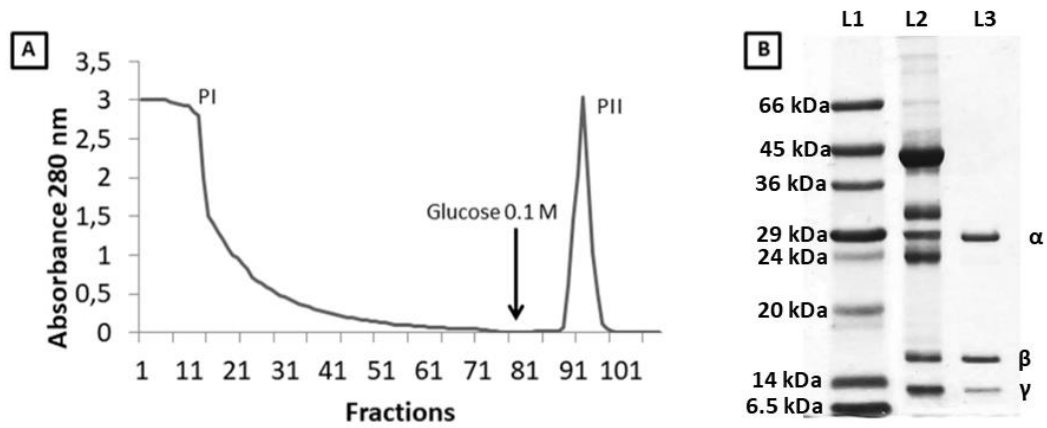


Figure 1. ConA purification by affinity chromatography. (A) Chromatogram of *C. ensiformis* crude extract on Sephadex G-50 column. (B) SDS-PAGE of purified ConA. (L1): Molecular weight markers (66–6.5 kDa); (L2): Crude extract of *C. ensiformis*; (L3): Purified ConA.

Table 1. Assignment of functional groups of alginate and CMC (ConA) film obtained with crosslinking concentrations of 2.5% and 5%.

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Functional group	Note	Ref.
3220 to 3350	O-H	Hydrogen-bonded O-H stretching vibration of alginate/CMC	19,20
2880 and 2935	C-H	Stretching vibrations of C-H	21
361560 and 1411	COO <sup>-</sup> groups	Asymmetric and symmetric stretching vibrations of COO <sup>-</sup> groups	21
1034 and 924	C-O C-C-H and C-O-H deformation	C-O stretching, incorporating contributions from C-C-H and C-O-H deformation	21
1750 and 1480		Possible interaction between the active groups of ConA and the functional groups of the film, especially the carboxylate groups (COO <sup>-</sup> )	22
2880 and 2935	CH <sub>3</sub> group	Rotational vibrations of the CH <sub>3</sub> group are attributed to different skeletal vibrations	27