



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ARCELINA PACHECO CUNHA

CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA
GALACTOMANANA DE *CAESALPINIA FERREA MART EX TUL. VAR*
FERREA: ESTUDO DO POTENCIAL ANTIVIRAL, HIPOGLICEMIANTE E
CICATRIZANTE

Fortaleza

2015

ARCELINA PACHECO CUNHA

CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA GALACTOMANANA DE
CAESALPINIA FERREA MART EX TUL. VAR FERREA: ESTUDO DO POTENCIAL
ANTIVIRAL, HIPOGLICEMIANTE E CICATRIZANTE

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Química do Departamento de Química da
Universidade Federal do Ceará, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química. Área de concentração:
Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria
Pontes Silva Ricardo

Fortaleza

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C977c Cunha, Arcelina Pacheco.

Caracterização e modificação química da Galactomanana de *Caesalpinia Ferrea* Mart Ex Tul.Var *Ferrea* : estudo do potencial antiviral, hipoglicemiante e cicatrizante / Arcelina Pacheco Cunha. – 2015.
88 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

1. Galactomanana. 2. Atividade antiviral. 3. Atividade hipoglicemiante. 4. Cicatrizante. 5. Lesões dérmicas. I. Título.

CDD 540

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.




Arcelina Pacheco Cunha

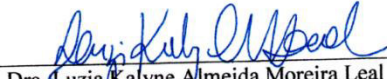
Tese aprovada em: 18/09/2015.




Dra. Mágila Maria Pontes Silva Ricardo
(Orientadora-UFC)



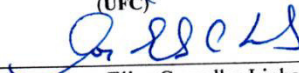
Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo
(Embrapa)



Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
(UFC)



Dr. Josué Mendes Filho
(UFC)



Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares
(UEL)

AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiríssimo lugar, Deus, meu senhor e mestre dos mestres, que ainda continua a me apoiar nos momentos mais fatigantes e desanimadores, fostes oh! Senhor meu amparo, meu refúgio, alento e elixir revigorante. Senhor, obrigada pelo teu olhar atento sobre mim!

Aos meus pais, pela minha vida, apoio e amor.

Ao meu filho Erick Tadeu pelo amor, compreensão e carinho.

À Professora Nágila Maria Pontes Silva Ricardo pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo seu exemplo como professora e pesquisadora na Universidade Federal do Ceará.

A todos os meus professores da Universidade Federal do Ceará, do curso de Pós- Graduação em Química, pela contribuição ao meu aperfeiçoamento acadêmico.

À professora Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil pelo apoio, conhecimentos transmitidos e dedicação.

À professora Nadja Ricardo por toda ajuda prestada a minha pesquisa, compreensão e carinho.

À Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo pela dedicação a pesquisa, firmeza nas decisões, apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Edilberto Rocha Silveira pelos conhecimentos transmitidos sobre RMN, apoio à pesquisa e amizade.

À professora Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal Pela disposição em cooperar com a minha pesquisa, conhecimentos transmitidos e respeito.

À professora Rosa Elisa Carvalho Linhares pelo apoio e análises feitas

À professora Sandra de Aguiar Soares pelas sugestões no Exame de qualificação e amizade.

Ao professor Josué Mendes Filho pelo apoio a pesquisa, incentivo e disponibilidade em ajudar.

Ao professor Luiz Constantino Grombone Vasconcellos, pelas sugestões no Exame de qualificação e amizade.

À Professora Ana de Fátima Urano Carvalho e sua equipe, em especial, Davi por toda ajuda prestada e sugestões ao trabalho.

Aos meus parentes e amigos pelo afeto e apreço.

À Antônia Flávia Justino Uchôa por toda amizade e dedicação à pesquisa.

À Delane Rodrigues por toda amizade e apoio a pesquisa.

Aos colegas e amigos da pós-graduação, pela amizade.

Ao grupo do Laboratório de Embalagem, EMBRAPA, obrigada, pelo apoio, conhecimentos passados e amizade, vocês são “superes”!

Ao grupo LabPIM, professores e colegas, pelo companheirismo e os bons momentos em harmonia. Vocês são “Superes”!

À funcionária e amiga, Tereza, pelas análises, amizade e profissionalismo.

Aos funcionários Orlando e Célia, da Coordenação da Pós-Graduação em Química, pelo pronto atendimento e serviços prestados com paciência e dedicação.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelas análises e apoio à pesquisa

Ao Centro Nordestino De Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), pelas análises. Cedidas.

À FUNCAP pela concessão da bolsa.

“Antes de julgar a minha vida ou meu caráter, calçe os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri, viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias. Percorra os anos que eu percorri, tropece onde eu tropecei e levante-se assim como eu fiz”.

Clarice Lispector

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver composições poliméricas que possam ser aplicadas como: antiviral, hipoglicemiante e como coadjuvante na cicatrização de lesões dérmicas. Para isso foi realizado uma purificação e modificação de galactomanana de *Caesalpinia ferrea Mart ex Tul.* Var Ferrea para avaliar o potencial de bioatividade desse polímero purificado e modificado por sulfatação. Após o procedimento de purificação e modificação química, a galactomanana de jucá foi caracterizada por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR), Análise Térmica (TGA e DSC), Energia Dispersiva de Raio-X (EDX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Tensão Superficial, Microscopia de Força Atômica (AFM), Potencial Zeta, Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), estudos em reologia, avaliação da toxicidade das galactomananas (nativa, purificada e sulfatada) através dos bioensaios contra náuplios *Artemia sp*; bioensaios in vivo, utilizando camundongos da raça swiss e avaliação da toxicidade frente aos neutrófilos humanos, mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Pelas análises realizadas nesse trabalho, o polissacarídeo, do tipo galactomanana, purificado e modificado por sulfatação, apresentou respostas bioativas, como antiviral, contra vírus da Herpes (HSV1) e poliomielite (PV1), hipoglicemiante e promissor coadjuvante na cicatrização de lesões dérmicas.

Palavras-chave: Polissacarídeos, Antiviral, hipoglicemiante, cicatrização, lesões dérmicas.

ABSTRACT

This study aims to develop polymeric compositions that can be applied to produce antiviral, hypoglycemic and as an aid in the healing of skin lesions. Therefore, the galactomannan from *Caesalpinia ferrea* seeds were purified, and subsequently modified by a chemical sulfation reaction. Then, purified sulphated galactomannan (JSGp and JSGs) were characterized by the following techniques: Infrared Transform Infrared spectroscopy (FTIR); Thermal Analysis (TG and DSC); Dispersive Energy X Ray (EDX); Scanning Electron Microscopy (SEM); Surface tension; Atomic Force Microscopy (AFM); Zeta potential; Gel Permeation Chromatography (GPC) and studies in rheology, among others. The toxicity of the galactomannans was evaluated for possible pharmacological applications. The following toxicity tests have been applied: assessment of toxicity through bioassays against nauplios *Artemia* sp; bioassays in vivo using Swiss mice; assessment of toxicity compared to the human neutrophils, as measured by lactate dehydrogenase (LDH) activity. According to the analyzes performed in this study, the purified galactomannan presented a hypoglycemic effect and a promising adjuvant in the healing of skin lesions. The galactomannan modified by sulfating presented antiviral properties against Herpes (HSV1) and polio (PV1) viruses.

Keywords: polysaccharides, Juca, antiviral, hypoglycemic, healing, dermal lesions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica da galactomanana de Jucá.....	22
Figura 2. Frutos (a), sementes (b), endospermas (c) e a galactomanana do jucá após desidratação (d).....	24
Figura 3. Partes constituintes das sementes de jucá.....	32
Figura 4 Mecanismo proposto para a reação de sulfatação de JSGp.....	33
Figura 5. Árvore do jucá	50
Figura 6. Despigmentação da JSG.....	51
Figura 7. Curvas de TGA e DTG, das JSG e JSGp.	53
Figura 8. Curvas de DSC das GMs de jucá.	55
Figura 9. Aspecto geral dos espectros de FTIR da JSG e da JSGp	56
Figura 10. Região do espectro de FTIR da JSGp e JSGs e as atribuições da substituições no carbono-6 da galactose.	57
Figura 11. RMN ¹ H da JSGp e a razão M/G.	59
Figura 12. RMN ¹³ C da JSGp e a razão M/G.	59
Figura 13. RMN ¹³ C CP-MAS das GMN e GMB	60
Figura 14 O tamanho das partículas, a reologia, e a tensão superficial do JSG, respectivamente: (i) mostra a forma de partículas monomodal distribuição com um valor médio de 100 nm; (II) o gráfico de reologia a diminuição observada da viscosidade com o aumento da velocidade de corte, típica de comportamento pseudoplástico das JSG	62
Figura 15 Valores da diminuição da Tensão Superficial da água pela JSG e JSGp.....	63
Figura 16 Micrografias de MEV em aumento progressivo, mostrados em (a), (b), (c) e (d), da JSGp, com aumentos de 1000x, 5000x, 10000x e 50000x, respectivamente.....	64
Figura 17. Representa a micrografia em 3D, em escala de altura de 3 μm, da JSGp, mostrando uma rede polimérica entrelaçadas característica.....	66
Figura 18. Representa a sobreposição de camadas, representada por uma micrografia em 3D, numa escala de altura de 200 nm, da JSGp	66
Figura 19. Micrografia bidimensional, em 500 nm de altura da JSGp, onde nas regiões mais superficiais, mostram os terraços e nas regiões mais profundas exibe uma formação espiralada.....	67

Figura 20. Micrografias em 3D de MFA, em escala de 50 nm, em que (a) e (b) representam, respectivamente, JSGs e JSGp.....	67
Figura 21. Diferenciação morfológica das JSGp e JSGp, através das micrografias obtidas por AFM	68
Figura 22. Micrografias obtidas por FMA das etapas inicial e final do processo de purificação da galactomanana de jucá.....	68
Figura 23. A inibição de HSV1 por C. Ferrea polissacárideo sulfatado (JSGs (%)) para os protocolos seguintes: (a) time of addition (-2 A +2); (b) a inibição da adsorção (IA); (c) inibição de penetração (PI) e (d) virucida (V) em HEp2 culturas de células pelo ensaio de redução de placas, com as concentrações indicadas. A percentagem de inibição viral (%VI) foi determinada em comparação com os controles, e os resultados são expressos como média \pm SD triplicado de experiências independentes.	71
Figura 24. O efeito da C. ferrea polissacárideo sulfatado (GMS) sobre o HSV1placa área. HEp2 as culturas de células foram tratadas com GMS nas concentrações de 500 mg/mL e 750 mg/mL, 1h e 2h após a HSV1 infecção. A área da placa foi determinada em comparação com os controles, e os resultados são expressos como média \pm DP de triplicado experiências independentes.	71
Figura 25. A inibição de PV1 por C.ferrea polissacarídeo sulfatado (JSGs) (%) para os protocolos seguintes: (a) tempo de adição (-2A ⁺); (b) a inibição da adsorção(IA); (c) inibição de penetração(PI) e (d) virucida(V) em HEp2 culturas de células pelo ensaio de redução de placas, com as concentrações indicadas. A percentagem de inibição viral(% VI) foi determinada em comparação com os controles, e os resultados são expressos como média \pm SD triplicado de experiências independentes.	73
Figura 26. A inibição de ferrea polissacarídeo sulfatado (JSGs) nas sínteses de HSV1 e PV1 ácidos nucleicos, nas cocentrações indicadas. Gel de poliacrilamidaeleetroforese de (A) amplicon de PCR para HSV1 ICP4 (138pb) e (B)RTPCR amplicon para PV1VP1-VP4 (102pb). MWDST. (M)e controles de vírus(VC); celular(CC); positivo inibidor(ACV eINF).	73
Figura 27. Massa corporea (A), Glicemia semanal (B), Teste oral de tolerancia de glicose (C) Ratos diabéticos tratados e não tratados com galactomanana. * p<0.05, diabetes vs. galactomanana.	76

Figura 28. Triacilglicerol (TAG) and colesterol total (Colesterol) de ratos diabéticos tratados ou não tratados com galactomanana. * $p < 0.05$, diabetes vs. galactomanana.	77
Figura 29. Massa corporea de ratos diabéticos tratados ou não tratados com galactomanana.	77
Figura 30. Avaliação da toxicidade da Galactomanana em neutrófilos humano através da mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com Galactomanana (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) e após os tempos de 15 minutos foi determinada a atividade da enzima LDH. Controle: Água - veículo; Tx: Triton X-100 (0,02% v/v) – padrão citotóxico. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).....	78
Figura 31. Efeito da Galactomanana sobre a desgranulação de neutrófilos induzidos por PMA. Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com galactomanana (GALAC, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente incubados com PMA (0,1 $\mu\text{m/mL}$). INDO: Indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de GALAC foram comparados ao grupo controle (100% de liberação de MPO). Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Veículo ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).....	79
Figura 32. Processo de cicatrização em feridas abertas em ratos Wistar com o uso dos géis a 1% de JSGs.....	80
Figura 33. Gráfico de cicatrização em feridas abertas em ratos Wistar.....	80

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Taxonomia da <i>Caesalpinia ferrea</i> ex Mart. Tur. Var. <i>Ferrea</i>	19
Tabela 2	Galactomananas da subfamília Caesalpiniaecae, com diferentes razões manose:galctose	22
Tabela 3	Rendimento bruto do processo de extração de JSG a partir dos endospermas e rediemnto liquido após ua purificação (JSGp).	51
Tabela 4	Composição química da JSG.....	52
Tabela 5	Constituintes Básicos de galactomananas antes e depois da purificação (JSG e JSGp) e sua modificação por sulfatação (JSGs), determinados por Análise elementar.	53
Tabela 6	Curvas de TGA e DTG mostrando as principais etapas de degradação da cadeia principal em temperatura acima de 100 °C, porcentagens de perda de massa e massa residual das membranas analisadas.	54
Tabela 7	Massas Molares de JSG , JSGp e JSGs.	58
Tabela 8	Análises das Propriedades viscosimétricas das JSGp e JSGs	61
Tabela 9	Classificação de substâncias tóxicas para administração subcutânea (SC) e peritonial (IP) (Berezovskaya, 2003).....	69
Tabela 10	Aconcentração inibitória 50% (CI ₅₀) de C.ferrea polissacarídeo sulfatado (GMS), (ACV) e interferon(INF) para HSV1 e PV1 em HEp2 células, por placas ensaio. GMS, ACV e INF 50% concentrações citotóxicas (CC ₅₀) e o índice de seletividade (SI) são também mostrados.....	70
Tabela 11	Classificação de substâncias tóxica para administração subcutânea (SC) e peritonial (IP) (Berezovskaya, 2003).....	Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Potencial bioativo da espécie <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart ex Tul. Var <i>Ferrea</i> .	19
1.2	Considerações gerais sobre as galactomananas	21
1.3	Modificação química da galactomanana por sulfatação	24
1.4	O combate a herpes labial e a poliomielite e o uso de medicamentos eficazes	25
1.5	O efeito antidiabético dos polissacarídeos	26
1.6	O uso de composições poliméricas na terapêutica das lesões cutâneas.	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos	30
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.1	Registro botânico da espécie <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart ex Tul.Var <i>Férrea</i> (jucá)	31
3.2	Isolamento e purificação de galactomanana (JSG) das sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart ex Tul.Var <i>Ferrea</i>	31
3.3	Modificação química por sulfatação da galactomanana, polissacarídeo extraído das sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart ex Tul.Var <i>Ferrea</i> , após a purificação.	32
3.4	Caracterização das galactomananas natural, purificada e sulfatada de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart ex Tul.Var <i>Ferrea</i> , respectivamente: JSG, JSGp e JSGs	34
3.4.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)	34
3.4.2	Análise da por RMN ¹³ C no estado sólido (CP-MAS) das JSG e JSGp para verificar o êxito do processo de purificação.	34
3.4.3	Análise das JSGp e JSGs por Ressonância Magnética Nuclear do próton (RMN ¹ H) e do carbono (RMN ¹³ C).	34
3.4.4	Análise Elementar (AE) das amostras JSG, JSGpe JSGs.	35
3.4.5	Determinação da composição de monossacarídeos nas amostras JSG e JSGp	35
3.4.5.1	Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	35
3.4.5.2	Caracterização por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (CG-MS)	36
3.4.6	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de JSG, JSGp e JSGs para estimativa da distribuição de massa molar.	36
3.4.7	Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC) de JSG, JSGp	37
3.4.8	Análises Termogravimétricas (TG/DTG) das membranas	37
3.4.9	Tensão Superficial (σ)	37
3.4.10	Viscosidade Intrínseca (η) da JSG	37
3.4.11	Potencial Zeta (Z_p) e Tamanho de partícula	38
3.4.12	Propriedades reológicas de solução aquosa JSG	38
3.4.13	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39

3.4.14	Análise de Microscopia de Força Atômica (MFA)	39
3.5	Atividades biológicas das amostras JSGp e JSGs.	40
3.5.1	Atividade antiviral da JSGs.	40
3.5.1.1	Testes sobre a bioatividade antiviral da galactomanana sulfatada (JSGs) frente aos vírus do herpes simplex (HSV 1) e Poliovírus (PV)	40
3.5.1.1.2	Obtenção das Células e vírus para os testes	40
3.5.1.2	Ensaio de citotoxicidade em células HEP2	41
3.5.1.3	Ensaio de redução de placa (PRA)	41
3.5.1.4	Ensaio Imunofluorescência (IFA)	42
3.5.1.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR).	42
3.5.1.5.1	O efeito de JSGs em HSV1	42
3.5.1.5.2	Disseminação de célula-célula de HSV1	44
3.5.1.5.3	O potencial sinérgico combinado de JSGs com Aciclovir (ACV) para HSV1	44
3.5.1.6	Análise estatística	44
3.5.2	Atividade hipoglicemiante da JSG, e JSGp	45
3.5.2.1	Teste de toxicidade aguda em camundongos da amostra JSGp	45
3.5.2.2	Testes de aplicação do hidrogel de JSGp: Efeito anti diabéticos em ratos diabéticos	45
3.5.2.2.1	Animais e o Tratamento	45
3.5.2.2.2	Teste de tolerância à glicose (GTT)	46
3.5.2.3	Eutanásia	46
3.5.2.4	Análise estatística	46
3.5.3	Atividade cicatrizante da JSGp	47
3.5.3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória e da citotoxicidade da JSGp	47
3.5.3.1.1	Isolamento de Polimorfonucleares (PMN)	47
3.5.3.1.2	Atividade anti-inflamatória da galactomana em neutrófilo humano	47
3.5.3.1.2.1	Desgranulação de neutrófilo humano induzida por PMD mensurada pela atividade da mieloperoxidase (MPO).	47
3.5.3.1.3	Teste de citotoxicidade em neutrófilo humano	48
3.5.3.1.3.1	Determinação da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).	48
3.5.3.1.4	Análise estatística	48
3.5.3.1.5	Testes de aplicação da solução de JSGp aplicado a cicatrização de feridas abertas	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Classificação botânica da espécie <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart ex Tul.Var Férrea	50
4.2	Rendimentos da extração e aspecto das galactomananas antes e depois da purificação	50
4.3	Análise Elementar (AE) de JSG, JSGp, JSGs	52
4.4	Análise termogravimétrica (TG/DTG) das JSGp	53
4.5	Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC) de JSG, JSGp	54
4.6	Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras de JSG, JSGp, JSGs	55
4.6.1	Etapas da purificação analisados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)	55

4.6.2	Espectroscopia de absorção na região de infravermelho(FT-IR) da amostra JSGs	56
4.7	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de JSGs	57
4.8	RMN ¹ H e RMN ¹³ C da JSGp: razão M/G	58
4.9	Espectro de RMN ¹³ C CP-MAS (Rotação do Ângulo Mágico de 54,7°em polarização cruzada)- <i>estado sólido</i> .	60
4.10	Viscosidade intrínseca das JSGp e JSGs	60
4.11	Análise das propriedades moleculares: Potencial Zeta(ζ), Tamanho de partícula e viscosidade	61
4.12	Tensão superficial	63
4.13	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da JSGp.	64
4.14	Microscopia Força Atômica (MFA) da JSG, JSGp e JSGs.	64
4.15	Atividades biológicas das amostras JSGp e JSGs	68
4.15.1	Teste de toxicidade da amostra JSGp em camundongos	68
4.15.2	Resultados dos testes sobre a bioatividade antiviral da galactomanana sulfatada de Caesalpinia férrea (JSGs) frente aos vírus do herpes simplex (HSV) e Poliovírus (PV)	69
4.15.2.1	Ensaio de citotoxicidade em células HEP2 e Atividade antiviral da JSGs	69
4.15.2.2	Resultado da atividade anti-herpética	70
4.15.3	Resultado da atividade Antipoliiovirus	72
4.15.4	Resultados dos testes sobre a atividade antidiabetes da galactomanana purificada de Caesalpinia ferrea (JSGp)	75
4.15.4.1	Teste de toxicidade da amostra JSGp em camundongos	75
4.15.4.2	Efeito do tratamento de galactomanana em ratos diabéticos	75
4.15.4.3	Resultados dos testes sobre a atividade cicatrizante da galactomanana purificada de Caesalpinia ferrea (JSGp)	78
4.15.4.3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória e da citotoxicidade da galactomana	78
4.15.4.4	Resultados dos testes de aplicação do hidrogel de JSGp para a cicatrização em feridas abertas em ratos Wistar	79
5	Conclusões	81
	REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Potencial bioativo da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. Var Ferrea.

A subfamília Caesalpinioideae inclui 171 gêneros e cerca de 2250 espécies de árvores arbustivas, pequeno e médio porte, pertencentes a regiões tropicais e subtropicais do planeta (Abdel-Hameed et al, 2013). Dentre as espécies da subfamília Caesalpinioideae estudadas se encontra o Juazeiro. Planta oriunda do Nordeste Brasileiro, principalmente Ceará e Pernambuco, de porte mediano, pertencente à família *Leguminosae* ou *Fabaceae*, popularmente conhecida como pau-ferro ou jucá (Balbach, 1997), *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul.Var Ferrea apresenta características morfofisiológicas tais como: folhas compostas, bipinadas, alternadas, de pínulas opostas; flores zigomorfas, amareladas, pequenas, dispostas em panículas pubescentes e terminais; vagens de cor castanho-avermelhada, achatadas, pequenas, encurvadas e duras contendo sementes escuras, tronco liso de cor marrom, com manchas esbranquiçadas (Braga, 1976). O fruto tem a forma de vagem indeiscente (não se abre quando maduro), duro e de cor escura (Figura 1). Essa planta é útil ao sertanejo do nordeste brasileiro na confecção de bengalas e utensílios agrícolas, devido à tenacidade característica do caule do juazeiro. A folhagem, que é perene, fornece bom alimento ao gado. Esta planta é muito usada na medicina popular do nordeste brasileiro por suas propriedades cicatrizante, antiúlceras, antidiabética, antiinflamatória (Carvalho et al,1996), expectorante, hemostática, e antibacteriana (Bragança, 2006).

Tabela 1.Taxonomia da *Caesalpinia ferrea* ex Mart. Tur. Var. Ferrea

TAXONOMIA	
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Fabales</i>
Família	<i>Fabaceae</i>
Subfamília	<i>Caesalpinioideae</i>
Tribu	<i>Caesalpinieae</i>
Gênero	<i>Caesalpinia</i>
Espécie	<i>Caesalpinia ferrea</i> ex Mart. Tur.

Fonte: Banco de dados da Wikipedia, <https://es.wikipedia.org/wiki/Caesalpinia>, acesso em 5/4/2015.

Algumas plantas da Caatinga demonstraram serem, por excelência, boas no combate a dor e inflamação. Isso se deve ao fato de conterem bioativos como flavonóides e taninos, que tem propriedade antioxidante, portanto, diversos efeitos biológicos que incluem, entre outros: ação anti-inflamatória, hormonal, anti-hemorragica, antialérgica e anticâncer (Araújo *et. al*, 2008). Os extratos de jucá têm se mostrado eficazes como antitumorais devido à ação comprovada de dois bioativos presentes: o ácido gálico e o metil gálico isolados dos frutos de *Caesalpinia ferrea Mart.* (Nakamura *et. al*, 2002). O ácido gálico tem se revelado uma alternativa no combate a alguns microorganismos como vírus, fungos e bactérias, bem como atividade broncodilatadora e antiinflamatória (Ueda, 2001; Nakamura *et. al*, 2002). Estudos apontam a *Caesalpinia ferrea* como promissor no tratamento da diabetes tipo I. Pesquisas realizadas em cobaias revelaram ação do extrato aquoso das cascas do jucá no sistema cardiovascular, induzindo bradicardia, hipoglicemia, hipotensão e diminuição das arritmias (Menezes *et. al*, 2007; Yang *et al* 2011; Savu *et al*, 2012). O extrato aquoso de jucá não apresenta embriotoxicidade, não afetando a reprodução em cobaias (Peters *et. al*, 2008) e ação contra infecções na cavidade bucal (Sampaio *et. al*, 2009). O extrato hidrometanólico bruto de jucá contém antraquinonas, alcalóides, flavanóides, lactonas, saponinas, açúcar, taninos, sesquiterpenos e triterpenos, sendo os taninos majoritários. Por conter polifenóis, o extrato hidrometanólico bruto de jucá apresenta ação antimicrobiana bem superior ao antibiótico clorexidina, que é usado contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans* (Sampaio *et. al*, 2009). Ferimentos por queimaduras podem apresentar infecções oportunistas causadas pelo gênero *Cândida* e bactérias do gênero *Estreptococcus*, *Estafilococcus* e *Pseudomonas*, entre outros (Correia *et al*, 1980). Nos membros do gênero *Caesalpinia* como *Caesalpinia sappan*, *Caesalpinia bonducella*, *Caesalpinia pulcherrima*, comumente usados na medicina indiana, são encontrado alguns fitoquímicos semelhantes à caesalpinina A, ácido elágico, ácido gálico, bergenin (Adhyapak & Dighe, 2013). O bergenin, um tanino hidrolisável, foi encontrado no exemplar *Caesalpinia digyna* que tem propriedades antihepatotóxica, antiulcerogênica, anti-HIV, antiarritmia, neuroprotetora, imunomoduladora, antimalárica e outras (Singh *et al*, 2009). A espécie *Caesalpinia sappan* contem vários terpenóides, flavonóides e fenólicos, de natureza antioxidantes, com propriedade antiinflamatória, anti acne, hepatoprotetora e hipoglicemiante (Badami *et al*, 2003, Washiyama *et al*, 2009, Nirmal & Panichayupakaranant, 2014). A *Caesalpinia cacalaco* é uma excelente fonte de fenólicos como ácido tânico e ácido gálico, antioxidantes, potente agente antimutagênico e antimicrobiano, principalmente contra o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, tipo R-0 e R-

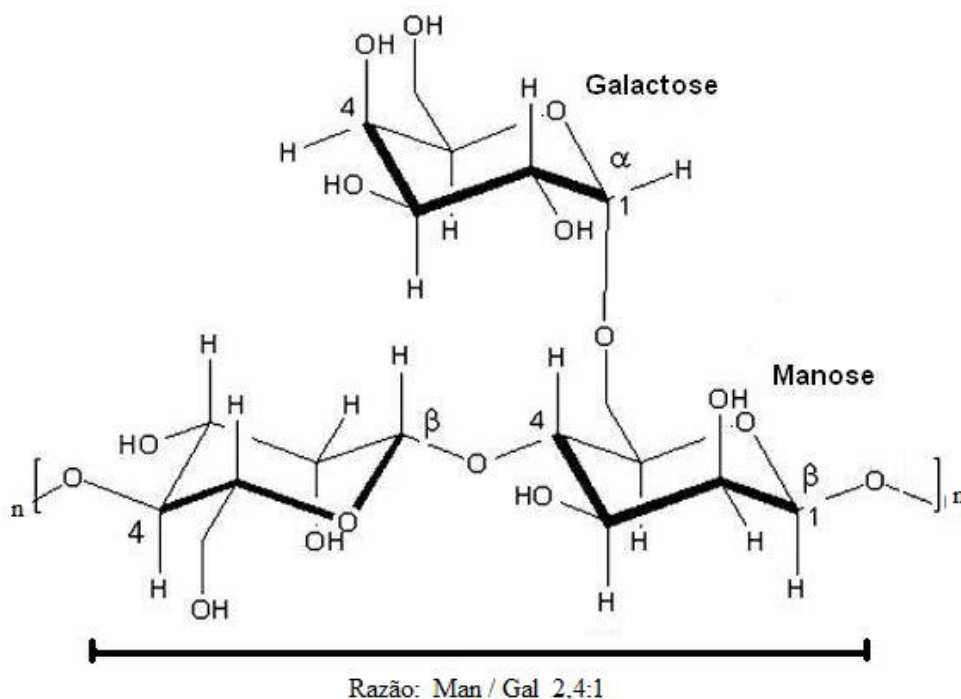
1472, causador da doença antraquinose numa espécie de feijão, comum na Índia, *Phaseolus vulgaris* (Garcia *et al*, 2010) . Nas flores da *Caesalpinia pulcherrima* foram constatado propriedade antioxidante, antiinflamatória e analgésica (Chakraborty, 2009). Pode-se concluir com o que foi exposto acima que o gênero *Caesalpinia* é rico em metabólito secundário e são bastante estudadas suas propriedades curativas. Vale ressaltar que apesar de algumas espécies pertencentes a esse grupo serem bastante conhecidas e estudadas, suas gomas (terminologia comercial) ou seus polissacarídeos retirados das suas vagens e sementes, ainda são poucos explorados para fins terapêuticos e comerciais.

1.2 Considerações gerais sobre as galactomananas

Os polissacarídeos são macromoléculas ou polímeros de monossacarídeos, constituídos, em geral, por anel furanosídeo (com cinco unidades de carbonos) ou anel piranosídeo de seis átomos de carbono, os quais podem estar arranjados tanto em cadeias lineares, ramificadas ou formar redes com cadeias interligadas. O grau de polimerização é o número de unidades monoméricas que forma a cadeia principal e varia com o tipo de polissacarídeo. O processo de formação das longas cadeias poliméricas ocorre através da reação de policondensação das unidades e a reação de formação da ligação glicosídica que se estabelece após a eliminação de uma molécula de água entre duas moléculas adjacentes do polímero. Os polissacarídeos são dessa forma macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos abundantes e importantes da natureza como, por exemplo, a celulose e o amido, a pectina, nas plantas, e o glicogênio, a heparina e a quitosana, nos animais.

As galactomananas são assim denominadas por apresentarem como estrutura genérica, uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) e resíduos de galactose unidos por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6) (Figura 1). Pelas proporções diferentes de Manose:Galactose, as galactomananas podem apresentar diferentes massas moleculares e solubilidade em água que está dependente do conteúdo de galactose substituinte. Assim as mananas, por exemplo, que não apresentam substituição, são geralmente insolúveis em água (Klyosov *et al.*, 2012).

Figura 1. Estrutura básica da galactomanana de Jucá



Fonte: Autor

Tabela 2. Galactomananas da subfamília Caesalpiniaecae, com diferentes razões manose:galctose.

Taxonomia		Razão	Referências
Subfamília	Espécie	M/G	
	<i>Caesalpinia cacalaco</i>	2,5:1	Srivastava & Kapoor, 2005
	<i>Acasia fistuosa</i>	3,0:1	Petkowicz, Reicher & Mazeau, 2003
Caesalpiniaecae	<i>Acasia leptocarpa</i>	3,0:1	Cerqueira et al, 2009
	<i>Acasia nodosa</i>	2,7-3,5:1	Virendra et al, 1994
	<i>Caesalpinia Pulcherima</i>	2,7:1	Santander et al, 2011
	<i>Caesalpinia spinosa</i>	2,7:1	Srivastava & Kapoor, 2005
	<i>Acasia tora</i>	3,0:1	Izydorczyk et al, 2005
	<i>Delonix regia</i>	4,28:1	Dea & Morrison, 1975
	<i>Gleditsia amorohoides</i>	2,5:1	Bourbon et al, 2010
	<i>Parkinsonia aculeate</i>	2,7:1	Petkowicz, Reicher & Mazeau, 2003

Fonte: Prajapati et al, 2013

As principais fontes comerciais de galactomananas são a goma guar (*Cyamoposis tetragonolobus*), Alfarrobas (*Ceratonia siliqua*) e goma de tara (*Caesalpinia spinosa*), que diferem, principalmente, pela proporção da distribuição de galactoses ligadas à cadeia principal de manose (Souza et al, 2010). O estudo estrutural de galactomananas é essencial para a indústria e aplicações experimentais. A ausência de toxicidade permite uso dentro das indústrias têxtil, farmacêutico, biomédica, de cosméticos e alimentos (Pawar & Lalitha, 2014). A principal propriedade desses polissacarídeos é que eles formam soluções muito viscosas em concentrações muito baixas. Outras propriedades das galactomananas incluem a sua utilização como emulsionantes, espessantes e agentes de estabilização. Todas estas propriedades são dependentes das propriedades química, física e estrutural do polímero, tais como a massa molar, a configuração anomérica, conformação em solução, e a posição de ramificação de polissacarídeos (Dakia, Wathelet & Paquot, 2007; Oliveira, et al, 2011). Apesar do uso de goma guar ser frequente na indústria, tem havido escassez de oferta e um grande aumento no custeio da produção agrícola desses polissacarídeos. Isso está levando os fabricantes procurar fontes alternativas sustentáveis para suprir o mercado (Mathur, 2011). O gênero *Caesalpinia* apresenta diferentes espécies com proporção de Manose:Galactose variando entre 2,5 a 4:28 (Prajapati et al, 2013). Além das diferentes proporções Manose:Galactose (Tabela 2) podem apresentar diferentes massas moleculares e solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte (Tester e Al-Ghazzewi, 2013). As galactomananas são bioativos importantes, funcionando como fibras que regulam a absorção de glicose no sangue e os níveis de insulina, além de reduzir os riscos de doenças e câncer no colón intestinal (Prajapati et al, 2013). Outra bioatividade mencionada na literatura é o uso de galactomananas do gênero *Caesalpinia* como adjuvante antitumoral que promove a maturação dos dentrócitos celulares, na presença de antígeno tumoral específico (Santander et al, 2011).

Figura 2. Frutos (a), sementes (b), endospermas (c) e a galactomanana do jucá após desidratação (d).



Fonte: Autor

1.3 Modificação química da galactomanana por sulfatação

Estudos de galactomananas modificadas foram realizados por Lima et al. (1996), que descreveram o comportamento de galactomananas de *Caesalpinia leiostachya* sulfatadas e Germano (1996), que analisou a atividade anticoagulante de galactomananas sulfatadas (*M. scabrella* e *C. fastuosa*). Propriedades biológicas foram analisadas por Pires et al. (2001), com a sulfatação da galactomanana extraída de *Senna macranthera* a fim de se obter um ativo heparinóico. Derivados oxidados e anfifílicos foram obtidos para galactomananas de sementes de *Leucena leucocephala* (Sierakowski et al, 2000). Esses derivados, juntamente com os derivados oxidados da galactomanana de *Cassia fastuosa* foram aplicados para obtenção de filmes como suporte para adesão de albumina (Sierakowski et al, 2000). Ono et al. (2003) verificaram possíveis propriedades antivirais da galactomanana sulfatada de sementes de *M. scabrella* e *L. leucocephala*. Polissacarídeos sulfatados (com cadeia de açúcares com alto peso molecular) desempenham funções estruturais importantes, uma vez que estão envolvidos em diversos processos biológicos, como adesão, proliferação e diferenciação celular. Além disso, possuem diversas atividades farmacológicas: como anticoagulantes, antiinflamatórios e antitumorais (Chang et. al, 2008) e antioxidantes (Wang et al, 2010; Souza et al, 2012). A sulfatação de polissacarídeos não somente pode aumentar a solubilidade em meios aquosos, como promove uma troca na conformação da cadeia do polímero, resultando em uma alteração em suas propriedades farmacológicas em organismos vivos (Yongzhen et. al, 2006).

1.4 O combate a herpes labial e a poliomielite e o uso de medicamentos eficazes.

O Herpes simplex virus (HSV) é vírus de cadeia dupla de DNA, que pertence à família herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, gênero Simplexvirus, responsável por doenças graves no ser humano. O herpes simples se representa como a doença viral mais comum no homem moderno, excluindo-se as infecções respiratórias. O herpes simples também é classificado como doença sexualmente transmissível, afeta somente o homem e sem variação sazonal. Cerca de 40 a 75% dos adultos apresentam lesões herpéticas recorrentes. A manipulação das lesões herpéticas no período clínico ativo tem alto risco de contaminação, pela grande quantidade de partículas virais no conteúdo vesicular ou bolhoso (Feugeas et al 2016). Dessa forma, o paciente deve ser orientado a, rapidamente, enxugar o conteúdo vesicular quando rompimentos acontecerem, pois podem contaminar áreas vizinhas e o uso de pomadas e cremes com agentes antivirais adequados e eficazes. A multiplicação viral no interior das células epiteliais e neurais inicia-se muito antes do aparecimento das lesões, ou seja, o tratamento para impedir a replicação viral deve ser o mais precoce possível, preferencialmente no período prodrômico. A aplicação e penetração de medicação em cremes, gel, líquidos e outras formas de apresentação tópica nas lesões herpéticas recorrentes pode ser dificultada pelas barreiras físicas e químicas representadas pela rede de fibrina, células epiteliais necrosadas e tecido conjuntivo ulcerado com exsudato e infiltrado inflamatórios exuberantes. Quando os medicamentos aplicados localmente não surtem efeitos, podem então funcionar como poderosos placebos e protetores oclusivos locais devido a essas barreiras criadas. Entre as principais drogas antivirais disponíveis para administração sistêmica estão os seguintes produtos: aciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir, valganciclovir, foscarnet e cidofir (Gavanji et al, 2015). Algumas dessas drogas são reservadas a pacientes imunocomprometidos e com herpes simples severo.

O HSV é um dos patógenos mais conhecido em saúde pública e é um agente causador de diversas doenças de ocorrência, em aproximadamente, 40 a 80 % da população mundial. A variedade de infecções causadas por esse vírus se manifesta com diferentes graus de gravidade, desde lesões superficiais, na pele e mucosas, até encefalite, especialmente em pacientes imunodeprimidos (Yamamoto et al, 2013). Poliovírus tipo 1 (PV1), um membro da família Picornaviridae e pertencente ao gênero Enterovirus, é um vírus de RNA positivo não envelopado (Lancaster e Pfeiffer, 2010). É um vírus entérico, e cerca de 1% dos indivíduos infectados desenvolvem poliomielite parálitica devido à invasão viral ao sistema nervoso central e destruição de neurónios motores (Lancaster e Pfeiffer, 2010). Além de sua

importância médica e epidemiológica, o poliovírus é um dos modelos mais bem compreendidos de vírus não envelopados de RNA. Atualmente, o poliovírus está sob controle na maior parte do mundo, devido às vacinas. Apesar dos esforços para erradicar o vírus, a doença permanece endêmica em alguns países da África e da Ásia, com 1.294 casos relatados em 2010, e, por conseguinte, representa uma importante ameaça para o resto do mundo. Não há uma droga específica para o tratamento da poliomielite, mas há compostos capazes de bloquear adsorção, desencapsulamento e/ou receptores celulares, tal como disoxaril pleconaril (Rotbart, 2002).

No entanto, há a necessidade de novos medicamentos antipoliiovirus que combinem baixa toxicidade e seletividade. Nos últimos anos, os compostos originados a partir de fontes naturais, como polissacarídeos, têm sido investigados e muitos deles têm se mostrado promissores como antivirais, pois além de aliar duas qualidades primordiais, como baixa toxicidade e seletividade, são de custos menos elevados.

1.5 O efeito antidiabético dos polissacarídeos

Nas últimas décadas, a fibra alimentar tem despertado grande interesse e ocupado um lugar importante na literatura científica, sendo considerada parte vital de uma dieta saudável. Recentemente, tem havido muito interesse na possibilidade de tratamento de diabéticos com dietas ricas em fibras (Mudgil and Barak, 2013). Mas, embora novas pesquisas demonstrem a importância de seu consumo, a qualidade da alimentação sofreu mudanças importantes, onde alimentos integrais foram substituídos por alimentos industrializados e refinados, o consumo de gorduras, açúcares e calorias aumentou e o de fibras diminuiu. As pesquisas sobre ingestão de alimentos processados industrialmente comprovam que as dietas pobres em fibras estão relacionadas com o aparecimento de enfermidades como diabetes mellitus, obesidade, doenças cardiovasculares, câncer de cólon, entre outras (Karna et al, 2011). A diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica caracterizada por uma alta concentração de glicose no sangue (hiperglicemia), que é devida a uma deficiência de insulina e/ou resistência à insulina. A hiperglicemia ocorre porque o fígado e o músculo esquelético não podem armazenar glicogênio e os tecidos são incapazes de utilizar a glicose. O tratamento da diabetes dá-se principalmente pelos seguintes meios: (a) terapia de reposição de insulina e (b) a utilização de agentes hipoglicêmicos orais, (c) dieta e exercício. Segundo pesquisadores,

muitas dessas doenças poderiam ser prevenidas através da introdução das fibras na alimentação (Brownlee, 2011).

Considerada modernamente como alimento funcional, a fibra alimentar desempenha no organismo funções importantes, como intervir no metabolismo dos lipídeos e carboidratos e na fisiologia do trato gastrointestinal, além de assegurar uma absorção mais lenta dos nutrientes e promover a sensação de saciedade, a qual é arma contra a obesidade (Friszman and Varela, 2013). Dentre as fibras alimentares investigadas, temos os polissacarídeos hidrocolóides como: pectinas, galactomananas, quitosana, beta-glucanas, alginato, celulose, carragenanas, ágar, gelatina entre outros (Vibke, Assaf and Phillips, 2014). Apresentam propriedades físicas como emulsificantes, estabilizantes, formam gel (em soluções aquosas) e filmes finos (Li and Nie, 2015). Os polissacarídeos promovem efeitos fisiológicos importantes, incluindo laxativos e/ou atenuação do colesterol plasmático e/ou atenuação da glicose sanguínea e ação imunomoduladora no intestino (Gidley, 2013; Xu et al, 2013). Eles apresentam resistência à ação de enzimas digestivas aumentando o bolo fecal, oferecendo proteção contra o câncer de cólon, melhorando a tolerância à glicose e a resistência à insulina, diminuindo as concentrações de triglicerídeos no sangue, portanto, promovendo o controle da diabetes tipo 2, que frequentemente está associada com obesidade, colesterol alto e pressão alta (Yao, Huang and Chiang, 2008; Yun, 2010; Hu et al, 2011; Lindstrom et al, 2012; Kaczmarczyk et al, 2012; Xie et al, 2013; Ezuruike and Prieto, 2014; Wanders et al, 2014; Kim et al, 2015).

Galactomananas são polissacarídeos hidrofílicos que formam soluções mucilaginosas e são consideradas fibra solúvel, com características interessantes tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. As pesquisas apontam as galactomananas como um promissor coadjuvante na prevenção e tratamento da hiperglicemia (Dong, Cai, Shen and Liu, 2012; Buriti et al, 2014). Estudos mostram que a galactomanana de diversos tipos de plantas diminui a taxa de glicose pós-prandial no sangue de ratos. Os resultados sugerem que essa captação de glicose no sangue está relacionada à viscosidade da galactomanana, em reduzindo a absorção intestinal de glicose, conseqüentemente, promovendo seu controle no sangue. (Srichamroen et al 2009; Slaughter et al 2002)

1.6 O uso de composições poliméricas na terapêutica das lesões cutâneas.

Muitas composições poliméricas têm sido utilizadas em queimaduras e outras lesões na pele, principalmente os hidrogéis (Alsarra et al. 2009). Essas composições estão divididas entre hidrogéis de polímeros naturais, hidrogéis de polímeros sintéticos e combinação das duas classes (Cardoso, Coimbra e Da Silva 2003; Huber et al. 2011). Os hidrogéis promovem a manutenção do meio ajudando no processo de cicatrização. O sódio presente no exsudato e no sangue interage com o cálcio das composições poliméricas, possibilitando a troca iônica que auxilia no desbridamento autolítico, na absorção e resultando na formação de um gel que conserva o meio úmido, no processo de cicatrização. Coberturas de alginato (Kaltostat^R, Sorbsan^R, Curasorb^R e outros) são considerados curativos interativos, pois sua estrutura muda de fibroso à consistência de gel a proporção que absorve o exsudato (Dealey, 2008).

Alguns bioativos, como arnica (Huber et al. 2011), papaína, elicina e a aloe vera, são utilizados em associação para uma regeneração tecidual eficaz. A crescente procura de drogas vegetais e seus bioativos, como recurso terapêutico, estão relacionados a vários fatores, como: resultados indesejáveis dos tratamentos com a medicina convencional (efeitos colaterais), impossibilidade de cura, consciência ecológica, dificuldade da maioria da população de ter acesso aos medicamentos e prejuízos causados pelo uso abusivo ou incorreto dos medicamentos sintéticos (Rates, 2001).

O emprego de compostos poliméricos tem exercido um papel vital no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos, devido a suas propriedades físico-químicas peculiares (Yu, et al 2009). O material é desenvolvido para que tenha uma resposta de eficácia prolongada. O desenvolvimento de biomateriais como os hidrogéis e outros materiais tem crescido devido à possibilidade de substituição parcial de materiais plásticos não biodegradáveis, que não tenham boa biocompatibilidade e que sejam tóxicos (Momemi et al 2009). Faz-se necessário expor que os efeitos atóxicos dos polímeros e as propriedades dos bioativos vegetais tais como antioxidantes, antiinflamatórias, hidratantes, bactericidas, bacteriostáticas e outros, podem contribuir de maneira eficaz na difusão controlada do princípio ativo dos extratos vegetais no tecido epitelial lesado, promovendo a diminuição da injúria celular e a regeneração tecidual mais acelerada (Nkafamiya *et al.* 2011). Surge a necessidade de desenvolver sistemas de liberação de drogas que promovam a eficácia e a confiabilidade da terapia, mantendo um efeito prolongado da droga de ação desejada, na

área alvo, evitando o declínio acelerado dos efeitos benéficos e que tenham boa reprodutibilidade (Masalova et al, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar e modificar por sulfatação a galactomanana de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul.Var Ferrea e avaliar o potencial de bioatividade como antiviral, no controle da diabetes e na cicatrização de lesões dérmicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair, purificar e sulfatar galactomanana de *Caesalpinia ferrea*;
- Caracterizar a galactomanana natural e sulfatada de *Caesalpinia ferrea* por FTIR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , TGA, DSC , Tensão Superficial, MEV, AFM, Potencial Zeta, GPC , Viscosidade e Reologia;
- Avaliar a toxicidade das galactomananas *Caesalpinia ferrea* purificada e modificada por sulfatação em diferentes testes;
- Investigar o potencial antiviral da galactomanana sulfatada de *Caesalpinia ferrea*;
- Comprovar a bioatividade antiinflamatória da galactomanana purificada de *Caesalpinia ferrea* em neutrófilos humanos;
- Avaliar a bioatividade antidiabetes da galactomanana purificada de *Caesalpinia ferrea*;
- Comprovar o efeito cicatrizante da galactomanana purificada de *Caesalpinia ferrea* em modelo de ferida aberta em ratos wistar;

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Registro botânico da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul.Var Férrea (jucá)

O material foi coletado no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, em abril de 2009. Os detalhes do registro são: Coletor: Arcelina Pacheco, Identificação: Maio de 2009, identificador: Prof. Dr. Edson Paulo Nunes, Departamento de Biologia da UFC. A exsicata da planta foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, na mesma universidade, com o número de registro 44695.

3.2 Isolamento e purificação de galactomanana (JSG) das sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul.Var Ferrea.

As vagens de jucá foram previamente selecionadas e secas em estufa a 40 °C. Após a secagem, foram retiradas das sementes para o isolamento e purificação da galactomanana de jucá. As sementes foram deixadas em imersão em água destilada por 30 minutos, a 85°C, para quebra da dormência e posterior retirada dos endospermas. Após a retirada da casca e tegumento das sementes, o endosperma foi colocado em uma partição água e álcool (1:4, v/v) a 60°C, por 20 minutos, para retirada de pigmentos fenólicos dos endospermas (Figura 3). Para extração da galactomanana foram utilizados 10 g do endosperma despigmentado, liofilizado e solubilizado com 900 mL de água destilada. O material foi mantido em chapa aquecedora a 75°C por 4 horas. Logo após, o material foi filtrado e o resíduo descartado. Até essa etapa, a galactomanana obtida recebeu a denominação de JSG. Para purificação da galactomanana, foi adicionado etanol 97% PA (1:3, v/v), para a precipitação do polissacarídeo, em agitação por 4 horas. Adicionalmente foi colocado NaCl 2,0 g/mol. Logo em seguida, material foi então submetido a três ciclos de precipitação com 99% de etanol (1:1, v/v), filtração, e centrifugação. O precipitado gelatinoso foi seco por liofilização, e o rendimento foi calculado. Após o processo de purificação, galactomanana de Jucá recebeu a designação de JSGp.

Figura 3. Partes constituintes das sementes de jucá

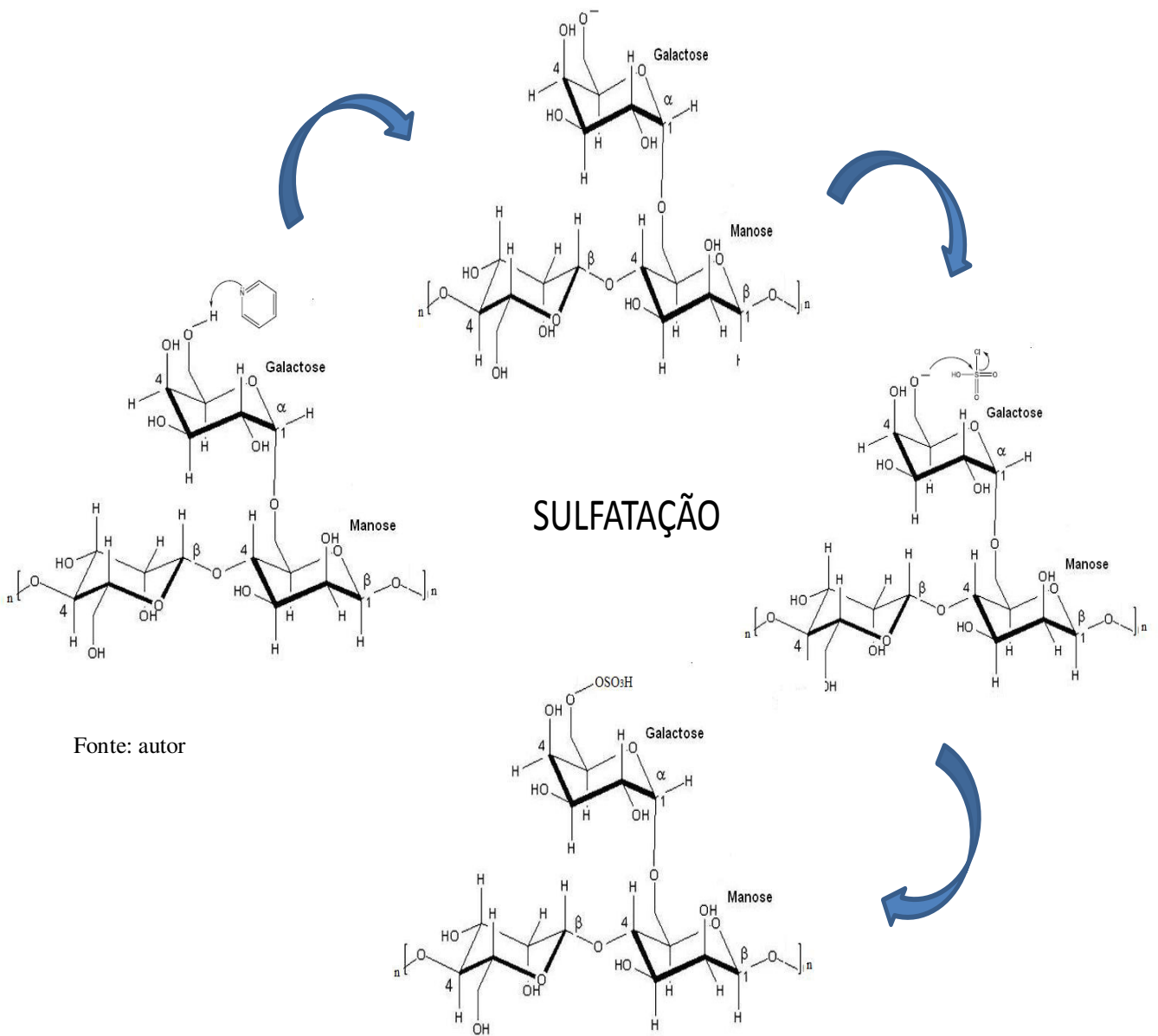


Fonte: autora

3.3 Modificação química por sulfatação da galactomanana, polissacarídeo extraído das sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. Var *Ferrea*, após a purificação.

O procedimento experimental adotado foi adaptado da metodologia proposta por O'Neill (1955) e Singh, Srivastava, Tiwari (2009) 300 mg de JSGp foram adicionados a uma mistura de N,N-dimetilformamida e piridina (50:5 v/v), com agitação à 25 °C por 12 horas. Após esse procedimento, a mistura foi condicionada, em reator de vidro, conectado a um banho termostatizado, à temperatura de 10 °C. Foi adicionado, em seguida, 10 mL de ácido clorossulfônico, lentamente, com agitação magnética contínua. Ao término da adição do ácido, a mistura reacional foi novamente resfriada a 4 °C por 24 h, em seguida, neutralizada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. O produto obtido foi dialisado (membrana de corte 12.000 g/mol) por 120 horas e posteriormente o polissacarídeo modificado foi ressuspenso em álcool 97%, centrifugado, ressolubilizado em 50 mL de água deionizada e liofilizado. Após esse processo o polissacarídeo sulfatado de jucá recebeu a denominação de JSGs (Figura 4).

Figura 4 Mecanismo proposto para a reação de sulfatação de JSGp



3.4 Caracterização das galactomananas natural, purificada e sulfatada de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. Var *Ferrea*, respectivamente: JSG, JSGp e JSGs

3.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)

As amostras JSG, JSGp e JSGs para análises de FT-IR foram pesadas numa razão 1:80, amostra/brometo de potássio (KBr), para a composição de pastilha de KBr, sob pressão de 8 toneladas (prensagem), numa janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , na razão de 4 cm^{-1} . A análise foi realizada num equipamento Perkin Elmer, modelo 16 PC.

3.4.2 Análise da por RMN ^{13}C no estado sólido (CP-MAS) das JSG e JSGp para verificar o êxito do processo de purificação.

As análises de RMN ^{13}C foram feitas por meio da utilização do equipamento Bruker, com frequência de 400 MHz, operando a 100 MHz para carbono e tempo de relaxação de 10 s, tempo de aquisição de 20 ms, usando uma sonda com rolamento duplo de 4 mm CP/MAS da Bruker e rotores a uma taxa de giro de 5,0 a 7,0 kHz. Aproximadamente, 100-150 mg das amostras de JSG e JSGp eram inseridas no rotor de cerâmica do espectrofotômetro de RMN para análise.

3.4.3 Análise das JSGp e JSGs por Ressonância Magnética Nuclear do próton (RMN ^1H) e do carbono (RMN ^{13}C).

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”.

Foram preparadas soluções das amostras de JSGp e JSGs em D_2O na concentração de 25 $\text{mg}\cdot 600\mu\text{L}^{-1}$, sendo as amostras deixadas em água deuterada nessa concentração por 24 horas a 80°C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm). Foi usado um composto 2,2-dimetil-2 silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0,00 ppm para ^1H) nas amostras dissolvidas em água deuterada.

O espectro unidimensional de ^1H foi realizado a 80°C com um tempo de espera entre cada aquisição de 2s, aquisição de 128 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32 k de número de pontos. O espectro unidimensional de ^{13}C foi obtido com um tempo de

espera entre cada aquisição de 1s, aquisição de 20k de transientes em uma janela espectral de 251,1 ppm e 32k de número de pontos.

Os sinais do ^1H e ^{13}C relativos aos hidrogênios anoméricos da manose em ^1H : 4,73 ppm; ^{13}C : 102,8 ppm (102,6 ppm) e da galactose em ^1H : 5,02 e ^{13}C : 101,0 ppm, respectivamente foram integrados para se obter a porcentagem relativa de ambos na amostra. Os picos foram integralizados utilizando o *software* VNMRJ 4.0.

3.4.4 Análise Elementar (AE) das amostras JSG, JSGp,e JSGs.

A composição dos elementos químicos presentes nas amostras JSG, JSGp,e JSGs foi avaliada por meio de um equipamento Perkin-Elmer CHNS 2400 Analyzer. Por meio dessa técnica foram quantificados os teores de carbono, hidrogênio e enxofre nas amostras de galactomananas. Para corroborar a eficiência do processo de purificação, foi realizada também a microanálise de nitrogênio, para avaliação da presença ou não de proteínas aderidas as galactomananas, uma vez que em sua estrutura básica não se encontra nitrogênio. Foi usado um fator de correção para calcular o teor de nitrogênio proteico na cadeia polimérica (equação 01) (Barros *et al.* 2013). Para JSGs os resultados dessas análises serviram de base para o cálculo (equação 02) do teor de sulfato incorporado nas galactomananas purificadas. Esse valor percentual de enxofre da amostra JSGs corrobora a eficiência no processo de sulfatação (Wang *et al.* 2012) .

$$\% \text{ Proteína} = \text{N}\% \times 6,25 \quad (1)$$

$$\text{GS} = (1.62 \times \text{S}\%) / (32 - 1.02 \times \text{S}\%) \quad (2)$$

3.4.5 Determinação da composição de monossacarídeos nas amostras JSG e JSGp

3.4.5.1 Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a determinação da composição monossacarídica de JSG e JSGs, por CLAE, foi realizada uma hidrólise ácida com o objetivo de obter os fragmentos oligossacarídeos. A amostra (100 mg) foi tratada com 1 mL de 72% (v/v) de H_2SO_4 num tubo de hidrólise e mantida num banho de água a 30 °C durante 1 h. Em seguida, 28 mL de água destilada foram

adicionada, ficando a solução ácida concentração de 4,0% (v/v). A amostra foi submetida a autoclave a 121 °C durante 1 h. Após a hidrólise ácida, a amostra foi neutralizada por carbonato de cálcio, filtrada (filtros millipore, 0,45µm) e injetada numa coluna cromatografia de permuta aniônica de elevado desempenho. A calibração foi realizada com soluções de açúcares padrões de L-raminose, a L-arabinose, D-glicose, D-galactose, D-manose e D-xilose (Maas et al, 2012)

A caracterização dos produtos resultantes foi realizada num sistema de CLAE (Shimadzu, Prominece) equipado com uma coluna Supercogel Cálcio (Bellefonte, USA) (30 cmx7,8 mm) e um detector de índice de refração (RID 10 A). As condições de operação consistiram de temperatura da coluna a 80 °C, fase móvel de água deionizada, com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min, e o volume de injeção de 20 uL.

3.4.5.2 Caracterização por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (CG-MS)

Após a hidrólise ácida de 10 mg de JSG (ácido trifluoroacético a 4 mol.L⁻¹, de durante 6 h a 100 °C), o hidrolisado foi acetilado utilizando anidrido acético e piridina (2:1 v/v), os alditois acetais gerados foram dissolvidos em clorofórmio e analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de unidade de massa Agilent com uma coluna HP-5MS metilpolisiloxano(30mx0,25mmx0,25mm). A análise foi realizada em uma razão de divisão de 1:20. O gás transportador foi hélio e um gradiente de temperatura de 190 a 230 °C, com uma variação de 4 °C.min⁻¹. As temperaturas do injetor, fonte de íons e de interface foram 280°C, 200°C e 230°C, respectivamente.

3.4.6 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de JSG, JSGp e JSGs para estimativa da distribuição de massa molar.

Para a estimativa de massa molar, os perfis cromatográficos de JSG, JSGp e JSGs foram determinados em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10A a 40°C. Para condução da análise, as amostras foram solubilizadas em 2,0 mL de água deionizada e em seguida, filtradas em membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 µm. A análise foi realizada com uma coluna Ultrahydrogel linear 7,8 x 300 mm, fase móvel de NaNO₃ 0,1 mol . L⁻¹ a temperatura ambiente com fluxo de 0,5 mL . min⁻¹ e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. A curva de calibração foi

construída utilizando-se de padrões de pululana (Shodex P-82, da Shawa Denko) com massas molares em intervalo de grandeza de 10^3 a 10^5 g . mol⁻¹.

3.4.7 Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC) de JSG, JSGp

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 400 °C, em célula calorimétrica, numa atmosfera dinâmica de Argônio (50 mL min⁻¹). A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura, utilizando padrão de índio (T_{fusão} = 156,6 °C) metálico com pureza de 99,99%. Utilizaram-se cápsulas de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 5 mg de amostra e 10 mg de Alumina (α -Al₂O₃) como referência. O aquecimento foi realizado em uma taxa de 10 °C min⁻¹ e o equipamento utilizado foi um DSC 50 da Shimadzu.

3.4.8 Análises Termogravimétricas (TG/DTG) das membranas

As curvas TG foram obtidas em um módulo termogravimétrico DTG-60H. As medidas termogravimétricas foram efetuadas usando suporte de amostra de platina, massas de amostra em torno de 5 mg, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, num intervalo de temperatura de 25 à 1000 °C, em atmosfera dinâmica de Hélio, na vazão de 30 mL min⁻¹ Shimadzu.

3.4.9 Tensão Superficial (σ)

As medidas foram determinadas utilizando-se um tensiômetro Lauda, modelo TD 1C , pelo método do anel, um Du Noüy platinum- iridium, diâmetro de 10 mm. As soluções aquosas de JSGp e JSGs foram preparadas nas concentrações variando de 0,025% a 0,3% (Moreira *et al* 2012).

3.4.10 Viscosidade Intrínseca (η) da JSG

As medições foram obtidas através de um viscosímetro Cannon-Fenske (Schott-Geräte, modelo AVS-350). Todas as soluções, em torno de 0,12% (w /v), concentração inicial,

foram preparadas por mistura com agitação magnética durante pelo menos 24 horas à temperatura ambiente ($25 \pm 0,01$ ° C), seguido por filtração em membrana de acetato de celulose com poros de $0,45\mu\text{m}$. As diluições médias das concentrações ($0,02$ a $0,12\text{g/dL}$) foram preparadas usando água destilada como solvente. Uma alíquota de 5mL de cada solução foi colocada num tubo capilar SCHOTT 5203 sob temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,01$ e acoplado ao termostato. Os valores dos tempos de drenagem obtidos são a média de seis determinações independentes. A massa molar viscosimétrica média (M_v) foi calculada usando-se a equação 03 de Mark-Houwink:

$$[\eta] = k \cdot M_v^a \quad (03)$$

Onde, k e a são constantes dependentes da natureza do soluto e do solvente. Os fatores $k = 0,49 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e o expoente $a = 0,63$ foram usados para os cálculos (Souza et al, 2010).

3.4.11 Potencial Zeta (Zp) e Tamanho de partícula

As medidas foram determinadas utilizando-se um equipamento Malvern 3000 Zetasizer Nano series ver. 7.01, em cela capilar (modelo DTS 1060) que acompanham o pacote básico do equipamento ZetaSizer (Malverne Instruments, UK). As análises do potencial zeta foram realizadas com alíquotas das suspensões aquosas de JSG, JSGp diluídas de 1:100 (v/v).. As suspensões foram preparadas e mantidas sob agitação mecânica de 7500 rpm, durante 5 minutos . Em seguida o pH das soluções foi ajustado para 7,4. A área de superfície específica aparente (ASEA), m^2/cc , as partículas em solução a 0,1% é calculado por (Equação 04).

$$\text{ASEA} = 6 \sum (v_i/d_i) / \rho \sum (v_i) \quad (04)$$

Quando v_i é o volume relativo, d_i é o diâmetro $[D(3,2)]$, ρ é a densidade do material (para valor não medido habitual é usado 2,65).

3.4.12 Propriedades reológicas de solução aquosa JSG

As propriedades reológicas de fluxo contínuo foram determinadas num reômetro 2000 Voltagem avançada AR controlada com banho de temperatura controlável e geometria do tipo 20 mm de diâmetro de cone e prato, o ângulo de $2^{\circ} 00'40''$ e um truncamento de 53 micrômetros, frequência de 1 Hz e taxa de cisalhamento de 0 a 1000 s^{-1} . A JSG solução foi

preparado na concentração de 0,5% (w / v) em água destilada a 25 ° C. a solução foi agitada a 800 rpm durante 24 h, o pH foi de cerca de 7,0. O modelo matemático proposto para avaliar o índice de pseudoplastia, viscosidade e índice de consistência foi o modelo da lei da potência

A Lei de Potência, também conhecida por modelo de Ostwald-de-Waelle, é um modelo matemático que pode ser deduzido através do modelo de Sisko, admitindo que μ_{∞} é pequeno, sendo dada pela expressão (Equação 05):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (05)$$

Em que K é designado por fator de consistência e n é o índice da lei de potência.

3.4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram realizadas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura da GMB através do Microscópio Eletrônico de Varredura de 20.000 kV de força, com ampliações de 1000x, 5000x, 10000x e 50000x, com a colaboração do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE.

3.4.14 Análise de Microscopia de Força Atômica (MFA)

As imagens de MFA foram obtidas por meio do microscópio Nanoscope IIIa (Veeco, CA), no modo de varredura intermitente (tapping mode), no qual a ponta de prova do equipamento varre a superfície da amostra com “batidas” intermitentes produzidas numa frequência próxima à de ressonância do cantilever. Tal modo de operação elimina quase que completamente as forças de arraste lateral, que ocorrem com frequência quando produzimos imagens no modo contato, evitando assim, danos na superfície de amostras frágeis. A sonda utilizada é feita de Si e possui constante de mola de aproximadamente 46 N/m (modelo TESP - Bruker). As imagens foram obtidas com resolução de 512 x 512 linhas (resolução máxima do equipamento), e velocidade de varredura de 1 Hz. As amostras de GMs foram diluídas em água Milli-Q em uma concentração variando de 0,2 - 1%, sob agitação magnética, durante 2 horas e acondicionada a uma temperatura de 10°C durante aproximadamente 8 horas. Em seguida, foram depositadas em um substrato de mica (aproximadamente 2 μ l) e deixadas em

repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. Finalmente as amostras são levadas para análise no MFA em temperatura ambiente.

3.5 Atividades biológicas das amostras JSGp e JSGs.

Para um melhor entendimento das escolhas das bioatividades testadas, faz-se necessário esclarecer a estratégia experimental adotada na seleção das amostras testes. Nesse contexto, por exemplo, a amostra teste JSGp não mostrou atividade antiviral, mas apresentou baixa toxicidade em ensaios curtos, sendo qualificada para os testes antidiabéticos. Da mesma forma, a amostra JSGs foi testada quanto à atividade cicatrizante, não apresentando boa adesividade à pele, sendo descartada para esse teste, porém, apresentou boa atividade antiviral, corroborando com a literatura que especifica a modificação por sulfatação para os testes antivirais. De acordo com o embasamento teórico, custeio dos testes e escolha das parcerias, os testes biológicos foram divididos em três experimentos de acordo com testes preliminares.

Para JSGs foram escolhidos dois testes antivirais: (1) para os vírus da poliomielite PV1 e (2) para herpes HSV1. Para a mostra JSGp foram realizados os testes antidiabético e cicatrizante.

3.5.1 Atividade antiviral da JSGs

3.5.1.1 Testes sobre a bioatividade antiviral da galactomanana sulfatada (JSGs) frente aos vírus do herpes simplex (HSV 1) e Poliovírus (PV)

3.5.1.1.2 Obtenção das Células e vírus para os testes

HEp2 (células epiteliais de carcinoma da laringe humano, ATCC CCL23), utilizado ao longo de, foram cultivadas em Dulbecco Eagle modificado de meio (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen - Gibco, EUA), 100 UI / ml de penicilina (Novafarma Indústria Farmacêutica, BR), 100 mg / ml de estreptomicina (Gibco BRL, EUA) e 2,5 mg / ml de anfotericina B (Meizler Biopharma S / A, BR). O HSV1 isolado a partir de espécimes clínicos e foi fornecida pelo Departamento de Virologia (IMPPG / UFRJ, BR) e a

PV1 (VR58) é uma cepa ATCC. Os estoques de vírus foram titulados por ensaio de placa e armazenados a -20 ° C em glicerol a 10%.

3.5.1.2 Ensaio de citotoxicidade em células HEP2

A citotoxicidade do composto em HEP2 células foi avaliada por ensaio do MTT (brometo de dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium) utilizando kit (Sigma Chemical. Co.,EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, as culturas de células cultivadas em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), e acerca de 70% de confluência em diferentes concentrações do composto e incubado durante 72h a 37° C a concentração citotóxica de 50% (CC50) foi calculada por análise de regressão, como a concentração da substância capaz de reduzir a densidade óptica do MTT em 50% em comparação com o controlo.

3.5.1.3 Ensaio de redução de placa (PRA)

A atividade antiviral de JSGs foi avaliada por Ensaio de redução de placas, acordo com Melo et al, 2008. Resumidamente, as culturas de células cultivadas em confluência de aproximadamente 100 % em microplacas com 24 poços (TPP, Suíça) foram tratadas com concentrações variáveis do composto (1500, 1000, 750 e 500 µg / ml para HSV1, e 10 ,5 ,2 ,5 e 1,25 µg /ml para o PV1) sob diferentes protocolos (ensaio de tempo de adição, ensaio de inibição da adsorção, ensaio de inibição da penetração e ensaio virucida). As culturas de células infectadas e tratadas foram sobrepostas com agarose nutriente (DMEM 2x/1,8% de agarose [v/v]) contendo MgCl₂ 25 mM (Yamamoto et al, 2009) e incubadas durante 40 h a 37 °C. Células foram fixadas com formaldeído a 10% de PBS, pH 7,3 , e coradas com 0,5% de violeta cristal em etanol a 20 %. A porcentagem de inibição viral (VI%) foi calculada como: $\% \text{ VI} = 1 - (\text{UFP em células tratadas} / \text{UFP no controle células}) \times 100$ (Nishimura et al, 1977) , onde, UFP é unidade formadora de placa. A concentração inibitória 50% (IC50) foi determinada como a concentração da substância capaz de reduzir o número de UFP em 50%, por análise de regressão. O índice de selectividade (SI) foi expresso como a proporção de CC50/IC50. O Ensaio de tempo de adição: realizada de acordo com Faccin Galhardi et al, 2012. Foram adicionadas várias concentrações do composto a culturas de células antes (1 h e 2 h), durante (tempo 0 h) e depois (1h e 2h) da infecção , seguida de PRA no ensaio de inibição da adsorção. As culturas de células foram pré-incubadas a 4 ° C durante 1 h e

submetidas a concentrações variáveis de JSGs simultaneamente com a infecção viral. As células foram novamente incubadas a 4 ° C durante 1 h, seguida de PRA (Minari et al, 2011); Ensaio de inibição da penetração. Este teste foi realizado como descrito por Cheng et al. (2004), com pequenas modificações. As células foram pré-incubados a 4 ° C durante 30 min , e mantidas infectadas a 4 ° C durante mais 90 minutos para adsorção viral. As culturas foram submetidas as concentrações de JSGs e incubadas a 37 ° C durante 10 min. As células foram então lavadas com PBS (pH 3) durante 1 min e imediatamente neutralizou-se com PBS (pH 11), seguido por PRA - ensaio virucidas : diluições de vírus foram incubadas a 37 ° C durante 1 h, com várias concentrações do composto, e inoculados seguido por PRA (Rincão et al, 2012) Zynvir (aciclovir sódio - ACV) (Novafarma Indústria Farmacêutica , Anápolis, GO, BR) e interferon (INF) (Meizler Biopharma S/A, SP, BR) foram utilizados como controle positivo de inibição viral.

3.5.1.4 Ensaio Imunofluorescência (IFA)

O ensaio foi realizado de acordo com Faccin et al. (2007). As culturas de células cultivadas em microplacas com 24 poços em lamínulas foram infectados ou com HSV1 ou PV1, na presença de concentrações variadas do composto. Aproximadamente, 18 h mais tarde, as células foram lavadas com PBS (pH 7,3), fixadas com acetona fria e bloqueadas com pó leite em pó desnatado a 2% PBS durante 30 min. As células foram incubadas com o soro de camundongo anti HSV1 (Santa Cruz Biotechnol., EUA) ou soro de coelho anti PV1 (INCQS, BR), seguido por três lavagens com Tween 20 a 0,05% em PBS e incubadas com soro de cobra anti IgG de rato (HSV1) ou soro de cobra anti IgG de coelho (PV1) Conjugados com FITC (Sigma Chem. Co, EUA). As células foram examinadas num microscópio de fluorescência (Zeiss axio Imager.A1), 100 células /lamínulas foram contadas e a percentagem de inibição de células fluorescentes calculada.

3.5.1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.5.1.5.1 *O efeito de JSGs em HSV1*

A síntese de DNA foi realizada como descrito por Tal-Singer et al. (1997). O DNA viral de células infectadas (2×10^6 células) e tratadas com diferentes concentrações do composto (150 , 50 , 25 , 12,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) foi extraído extraídos usando comercial kits (QIAamp ® DNA Mini e Mini sangue). DNA viral a partir de as células infectadas tratadas com

aciclovir (3 mg / ml) (Zynvir – Nova farma Indústria Farmacêutica, BR) , ADN virai de células infectadas sem Tratamento JSGs e ADN a partir de células não infectadas e sem tratamento foram utilizados como controles.

Os pares de primers usados para ICP4 foram: ICP4 (50GGCGGGAAGTTGTGGACTGG30) e ICP4R(50CAGGTTGTTGCCGTTTATTGC30). A reação foi realizada em num volume final de 25 ml, contendo 20 mM Tris - HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂ , 0,2 mM de cada dNTP, 2 moles de cada um específico iniciador (Invitrogen, Life Technologies, UK), 2,5 U de Taq DNA polimerase, e 5 ml de DNA extraído. O programa consistiu de desnaturação a 94 ° C durante 4 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 1 min, hibridação a 60 ° C durante 1 min, e a polimerização em 72 ° C durante 1 min, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72 ° C. Dez microlitros dos produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 12 % gel. Os tamanhos esperados para ICP4 são 138 pb. O efeito de JSGs na células, Síntese de RNA do PV1 foi avaliado por RT-PCR, como descrito por Pliaka et al , 2010. RNA viral infectados e as células tratadas (2 × 10⁶ células) com diferentes concentrações do composto (10, 5, 2, 5 e 1,25 µ/ml) foi extraída com kit comercial (QIAamp® RNA Mini Kit). O RNA viral a partir de células infectadas e tratado com alfa2B humano interferon (10000 IU/mL) (Meizler Biopharma S / A, BR), RNA viral das células infectadas sem tratamento e RNA a partir de células não infectadas e sem tratamento foram usados como controles. Inicialmente, a transcrição reversa foi realizada com um volume final de reação de 20 ml. Uma primeira mistura constituída por 5 pmol de iniciadores aleatórios , dNTP 1 mM e água livre de RNase até um volume de 7 ml foi preparada. Sete microlitros da primeira reação foram misturadas com 5 ml de RNA viral e incubADOS durante 5 min a 65 ° C. Posteriormente, uma segunda mistura constituída por tampão MMLV, 1 × , 0,01 M de DTT, 100 U de transcriptase reversa MMLV (*) e e água livre de RMNase até um volume de 8 ml foi preparada. Oito microlitros da segunda mistura de reação foram adicionadas a cada amostra e em seguida incubadas durante 10 minutos a 25 ° C, 50 min a 37 ° C e 15 min a 70 ° C. A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 ml contendo dNTP 0,4 mM, 2 pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase com o tampão de PCR A (*) e de cDNA. Iniciadores específicos para PV, genes do capsídeo (VP1-VP4) foram 50AGTTTCACCGAAGGCGGA30 (F) e 50CGCTGACACAAAACCAAGGA30 (R), resultando em um produto amplificado de 102 pb. O programa de PCR consistiu de uma desnaturação a 95 ° C durante 10 min , seguido por 40 ciclos de desnaturação durante 15 s a 95 ° C, hibridização a 60 ° C durante 1 min e

extensão de 1 min a 72 ° C. O ciclo final de extensão foi de 7 min a 72 °C. Alíquotas de dez microlitros dos produtos de PCR foram resolvidos num gel de poliacrilamida a 12 %.

3.5.1.5.2 Disseminação de célula-célula de HSV1

A avaliação da propagação célula-célula HSV1 foi realizada de acordo com Ekblad et al, 2010. As culturas de células foram submetidas a concentrações do JSGs 1 e 2h após a infecção e as placas foram avaliadas após, aproximadamente, 40h de incubação. Uma média de 10 áreas de placas foi estimada por imagem digital, usando a imagem Software J(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.5.1.5.3 O potencial sinérgico combinado de JSGs com Aciclovir (ACV) para HSV1

O teste foi realizado de acordo com Gong et al. (2004), com o mínimo de modificações. O JSGs foi testado separadamente para quatro concentrações: $0,25 \times IC_{50}$, $0,5 \times IC_{50}$, $1,0 \times IC_{50}$, $2,0 \times IC_{50}$, e ACV também foi testada separadamente para quatro concentrações: $0,25 \times IC_{50}$, $0,5 \times IC_{50}$, $1,0 \times IC_{50}$, $2,0 \times IC_{50}$. A mistura de várias concentrações de JSGs e ACV numa proporção fixa, ou seja, $0,25 \times IC_{50}$ de JSGs combinado com $0,25 \times IC_{50}$ de ACV, adicionados concomitantemente à infecção, foi submetido a PRA. O grau de interacção JSGs e ACV foi encontrado pelo índice de combinação (IC) = $CA/CB + IC_{50A}/IC_{50B}$, onde C_A e C_B são as concentrações das substâncias A e B utilizados em combinação para alcançar um efeito de 50 % , e IC_{50A} e IC_{50B} são as concentrações inibitórias para os agentes por si só para provocar o mesmo efeito. Um IC de menos do que, igual a ou superior a 1 indica sinergia, aditividade e antagonismo, respectivamente (Zhao et al, 2004).

3.5.1.6 Análise estatística

Anova seguida do teste de Tukey (BioEstat 5.0 para Windows XP, 2007) foram aplicados para determinar a diferença entre os experimentos com os grupos de polissacarídeos sulfatados e controle. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5.2 Atividade hipoglicemiante da JSGp

3.5.2.1 Teste de toxicidade aguda em camundongos da amostra JSGp

O ensaio de avaliação da toxicidade aguda em camundongos da JSGp foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Vasconcelos et al (1994), com modificações. A amostra foi administrada via injeção intraperitoneal (0,3 mL. 10 g⁻¹ de peso corpóreo) nas doses de 25, 50, 100, 150 e 200 mg. Kg⁻¹ de peso corpóreo. Para cada dose foi utilizado um grupo de seis camundongos machos Swiss obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen-UFC), pesando de 12-15 g e acomodados no Biotério de Experimentação do Bioprospec-UFC até atingirem peso ideal para o ensaio (20-25 g). Os animais receberam ração e água *ad libitum* e mantidos à temperatura de 20-22 °C e ciclo 12 h claro/12h escuro (12/12 h). Após 72 h da inoculação das amostras em diferentes concentrações, foram contados os indivíduos mortos, caso tenha ocorrido, para calcular medidas de dispersão como média, desvio padrão e coeficiente de variação. Foi utilizado como controle negativo uma solução de NaCl 0,9 %.

3.5.2.2 Testes de aplicação do hidrogel de JSGp: Efeito anti diabéticos em ratos diabéticos.

3.5.2.2.1 Animais e o Tratamento

Ratos Wistar machos Cinco dias de idade foram separados de suas mães durante 8 h. Eles foram divididos em dois grupos: um grupo (grupo diabético) recebeu uma injeção intraperitoneal (ip), de STZ (120 mg / kg de peso corporal) recentemente diluído num tampão de citrato (citrato 10 mM, Na, pH 4,5) e a outra (não grupo D) recebeu apenas o veículo (ip) num volume equivalente e serviu como controle (grupo C, n = 6). Na 10^a semana de idade, os ratos do grupo D foram divididos em dois grupos. Um grupo foi tratado com galactomanano a 10 mg / kg de peso corporal cada dia dissolvido em água e administrados por sonda oral, duas vezes por dia (grupo G) durante os próximos 5 sem luz. Os ratos do segundo grupo (grupo D), foram tratados com água por sonda oral, durante os próximos 5 sem luz. Os ratos dos três grupos foram mantidos sob 12 horas de luz, 12 h ciclo escuro (luzes acesas em 0600 h), a 23 °C, e com pleno acesso a alimentos (Nuvilab pelotas de comida equilibrados; Nuvital SA, Colombo, Brasil) . O peso corporal, glicemia, água e ingestão de alimentos foram medidos

semanalmente entre o desmame sacrificar (12 semanas). Cauda sangue foi coletado para determinação de glicose usando um glicosímetro (Lifescan, Escócia, Reino Unido).

3.5.2.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Teste de tolerância à glicose (poGTT) foi realizado em 800 h, após 12 h de jejum (comida foi retirada em 2000 h na noite anterior). Em 10 semanas de idade (antes do tratamento) e 15 semanas de idade (durante o tratamento) animais, a carga de glucose (75 mg /kg de peso corporal) foi administrada por sonda esofágica, e amostras de sangue da cauda foram recolhidas a 0, 5, 15, 20, 30, 60, e 90 min após a administração de glicose para a determinação de glucose no sangue.

3.5.2.3 *Eutanásia*

Na décima sexta semana, todos os animais (12 horas em jejum) foram decapitados sob anestesia com tiopental de sódio (20 mg / kg de peso corporal) em 800 h, e o sangue do tronco foi recolhido. O soro foi utilizado para dosagem de triacilglicerol (TAG) e de colesterol. Após laparotomia, a região inguinal (SC), epidídimo (PE), e retroperitoneal (RP), regiões de bolsas de gordura, foram retiradas e pesadas (balança analítica, com precisão de 0,1 mg). Os procedimentos descritos seguiram o protocolo institucionalmente aprovado em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Instituto de Ciências Biomédicas, seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal e da Federação das Universidades para a Handbook Bem-Estar Animal na Administração de Cuidado de Animais de Laboratório.

3.5.2.4 *Análise estatística*

Para os resultados foram utilizados o método de análise de variância com dois fatores (ANOVA) com medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni que foi utilizado para comparação da evolução semanal de peso corporal e glicemia, dos perfis de glicose de poGTT. Para outras comparações, foi adoptada uma análise de variância one-way, seguido pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A

análise foi realizada utilizando o pacote de software de estatística GraphPad Prism Versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

3.5.3 Atividade cicatrizante da JSGp

3.5.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória e da citotoxicidade da JSGp

3.5.3.1.1 Isolamento de Polimorfonucleares (PMN)

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %) com viabilidade de $90 \pm 2,0$ % (exclusão ao azul de Tripán), foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE (*buffy coat*) e isolados de acordo com o método de Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5 % (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

3.5.3.1.2 Atividade anti-inflamatória da galactomana em neutrófilo humano

3.5.3.1.2.1 Desgranulação de neutrófilo humano induzida por PMD mensurada pela atividade da mieloperoxidase (MPO).

A suspensão de neutrófilos humanos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada por 15 minutos a 37°C com Galactomanana (10, 50 e 100 µg/mL), Água (controle do veículo), HBSS (células não-tratadas) ou indometacina (100 µM, droga padrão). A seguir foi adicionado forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 0,1 µM) por 15 minutos a 37°C. Decorridos esse tempo, o material foi centrifugado e o sobrenadante obtido foi empregado para determinação da atividade da MPO. Para tanto, aos 50 µL do sobrenadante foi adicionado PBS (100 µL), tampão fosfato (50 µL) e H₂O₂ (0,012%). Após 5 minutos a 37°C foi acrescido 20 µL de 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A absorvância foi determinada em 620 nm. A construção de uma curva padrão pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 – 3 U/mL) permitiu relacionar a absorvância com as unidades enzimáticas/mL. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da liberação de MPO (Úbeda e colaboradores, 2002; DE YOUNG *et al.*, 1989).

3.5.3.1.3 Teste de citotoxicidade em neutrófilo humano

3.5.3.1.3.1 Determinação da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).

A LDH é uma enzima citosólica, assim sua detecção no fluido extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade celular e na avaliação da viabilidade celular constitui num método mais sensível que a técnica de exclusão com azul tripan. O princípio do ensaio constitui numa medida espectrofotométrica do consumo de NADH durante a ação catalítica da LDH que reduz o piruvato a lactato (Bergmeyer; Bernt, 1963). A citotoxicidade da galactomanana foi avaliada pela medida da LDH em suspensão neutrófilos, através de Kit de detecção Liquiform (Labtest, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante, sendo a atividade enzimática determinada com emprego da fórmula abaixo (equação 06).

$$A = [(A1 - A2) / 2] \times 1746,03 \quad (06)$$

Onde:

A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1 = absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2 = absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1746,03 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

A toxicidade da Galactomana foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas diárias em triplicata.

3.5.3.1.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.5.3.1.5 Testes de aplicação da solução de JSgp aplicado a cicatrização de feridas abertas

Foram utilizados 15 ratos machos da raça Wistar de idade adulta e peso corpóreo médio de 203 g a 157g. Os animais foram mantidos isolados em gaiolas apropriadas e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com doses adequadas de Cloridrato de

ketamina 10% e cloridrato de xilazina 2%, de acordo com peso do animal. Ampla tricotomia era feita na região do dorso do animal, em seguida submetida à anti-sepsia com álcool iodado a 2% e proteção com campos cirúrgicos estéreis. Posteriormente, com um molde de polipropileno especificamente confeccionado; a pele é esticada de modo a evitar a formação de pregas. O molde é apoiado sobre a pele, para a demarcação da área de 2 cm², isto feito, o molde era retirado para a realização da incisão, cortando assim um segmento quadrado da pele para posterior aplicação na ferida aberta do medicamento pretendido, de acordo com o grupo selecionado. Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos de três membros. O grupo 1: controle com trofodermin creme (bactericida para aplicação tópica de amplo espectro); Grupo 2: tratados com solução salina (NaCl a 0,9%); Grupo 3: aplicação do hidrogel de galactomanana (JSGp). O período de medidas das feridas, pesagem, tricotomia e tratamento era realizado a cada 4 dias, até completar 20 dias de experimento. A limpeza das gaiolas era feita diariamente para manter o local asseado e livre dos dejetos dos animais. As lesões de dois cm² foram mensuradas através de um paquímetro Digital Caliper Within 300 mm, com precisão de 0,01mm e por meio deste avaliados o comprimento e largura da lesão. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O protocolo utilizado está de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Ceará.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Classificação botânica da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul.Var *Férrea*.

A espécie vegetal foi identificada como *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.Var. *Férrea*, Família das Fabaceae-caes, Sub família Caesalpinoidea e gênero *Caesalpinia* (Figura 5) . Recebeu um numero da exsicata 44695, estando depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará .

Figura 5. Árvore do jucá



Fonte: autor

4.2 Rendimentos da extração e aspecto das galactomananas antes e depois da purificação.

Pelas condições submetidas nesse trabalho, o rendimento após a extração e purificação foi de $31 \pm 1\%$ (Tabela 3) de galactomanana retirada dos endospermas das sementes de *Caesalpinia ferrea*. Resultados similares foram encontrados na literatura, cujo rendimento variava de 25,5 a 30% para a maioria das espécies da subfamília Caesalpinioideae (Buckeridge et al, 1995). Baseado nesses valores, o método empregado foi eficaz para extração de galactomanana das sementes de jucá (JSGp) que apresentou baixos teores de proteína, açúcares e nitrogênio e resíduos de impurezas (tabela 4). O aspecto visual revela a

saída de compostos fenólicos que dão a esse polímero, antes da despigmentação, cores variando do amarelo ao marrom. O uso de NaCl na concentração de 0.2g/mol foi eficiente para retirada de proteínas, pois não foi possível detectar nitrogênio por meio da análise elementar. Pela mesma análise, a galactomanana de jucá, antes da purificação apresentou um teor de 0,38%, que pelo fator de correção ($\%N \times 6.25$) corresponde a 2.38 % de proteína (ver Tabela3).

Tabela 3 Rendimento bruto do processo de extração de JSG a partir dos endospermas e rendimento líquido após a purificação (JSGp).

Extração	Rendimento (%)
JSG	70 ± 3
JSGp	31 ± 1

Fonte:autor

Com o método de extração proposto foi possível melhorar o aspecto das JSG de jucá, ficando uma goma mais clara com propriedades físico-químicas propícias para sua comercialização (Figura 6).

Figura 6. Despigmentação da JSG



Fonte: autor

Tabela 4. Composição química da JSG

	Composição de açúcares (%) ^a						Humidade cinzas (%)	Proteína (%)	Análises elementar (%)						
	Man	Gal	Ara	Glu	Rha	Xyl			C	H	N	S	Na	Ca	
JSG^b	33.58	12.39	0.06	0.94	n*	n*	15.44 ^d	0.06	n*	37.48	6.43	n*	n*	<0.3	<0.3
JSG^c	38.78	13.34	0.49	1.33	n*	n*	15.87 ^d	1.50	2.38	38.03	6.68	0.38	n*	<0.3	<0.3

Áreas relativas do polissacarídeo hidrolisado por HPLC; Man: manose; Gal: galactose; Ara: arabinose; Glu: glicose; Rha: ramnose; Xyl: xilose; n *: os valores não-detectados. b Depois do processo de purificação; c antes do processo de purificação, d valores aproximados.

4.3 Análise Elementar (AE) de JSG, JSGp, JSGs

Por meio desta técnica foram quantificados os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre nas amostras de JSG, JSGp, JSGs. Os resultados dessas análises são apresentados na Tabela 5, onde podemos notar que o percentual de enxofre da amostra de JSGs, corrobora a eficiência no procedimento de sulfatação. A sulfatação com ácido clorosulfônico-piridina foi eficiente para a sulfatação da JSGp. Neste processo utilizou-se como catalisador a piridina, a qual possui um par de elétrons disponível que pode formar pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos polissacarídeos, e isto faz com que a nucleofilia desses grupamentos aumente, tornando-os mais reativos (Wang et al, 2012). O uso do ácido clorosulfônico como agente sulfatante apresentou uma desvantagem que foi a sua degradação por umidade, pois a inativação do ácido clorosulfônico pela água se deve a sua rápida interação com ela, diminuindo a eficiência no processo de sulfatação. Portanto o uso do banho termostático à temperatura de 10°C durante a colocação do ácido no reacional foi de extrema importância ao êxito da reação apresentada nesse trabalho.

Tabela 5 Constituintes Básicos de galactomananas antes e depois da purificação (JSG e JSGp) e sua modificação por sulfatação (JSGs), determinados por Análise elementar.

Amostras	Carbono (%)	Enxofre (%)	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)	Grau de sulfatação (%)	Proteína (%)
JSG	38,03	n.e*	0,38	6,68	0,00	2,37
JSGp	37,48	n.e*	n.e*	3,25	0,00	0,00
JSGs	13,36	14,78	n.e*	2,78	1,19	0,00

* não encontrado.

4.4 Análises Termogravimétricas (TG/DTG) das JSGp

Os resultados de análise termogravimétrica mostrados na Figura 7 para as amostras de JSG e JSGp, evidenciaram alterações no comportamento térmico antes e depois do processo de purificação. Para JSG, a temperatura correspondente a maior perda de massa (68,36 %) está por volta de 302°C, enquanto que na JSGp, a perda de massa (69,23%) ocorre por volta de 312°C. Isso está relacionado ao fato de que a degradação da cadeia polimérica acontece a temperaturas maiores nas JSGp, correspondendo a uma maior estabilidade térmica após a remoção de pigmentos. Observou-se também que JSGp apresentou menos sólidos inorgânicos e/ou impurezas, evidenciando-se uma massa residual inferior a 0,01% para as JSGp quando comparadas a massa residual antes da purificação (em torno de 1,5%) (Tabela3). A primeira perda de massa da JSG e JSGp é de 15,14% e 16,02%, respectivamente, e está relacionada a umidade da amostra, onde demonstra um caráter hidrofílico das amostras.

Figura 7. Curvas de TGA e DTG, das JSG e JSGp.

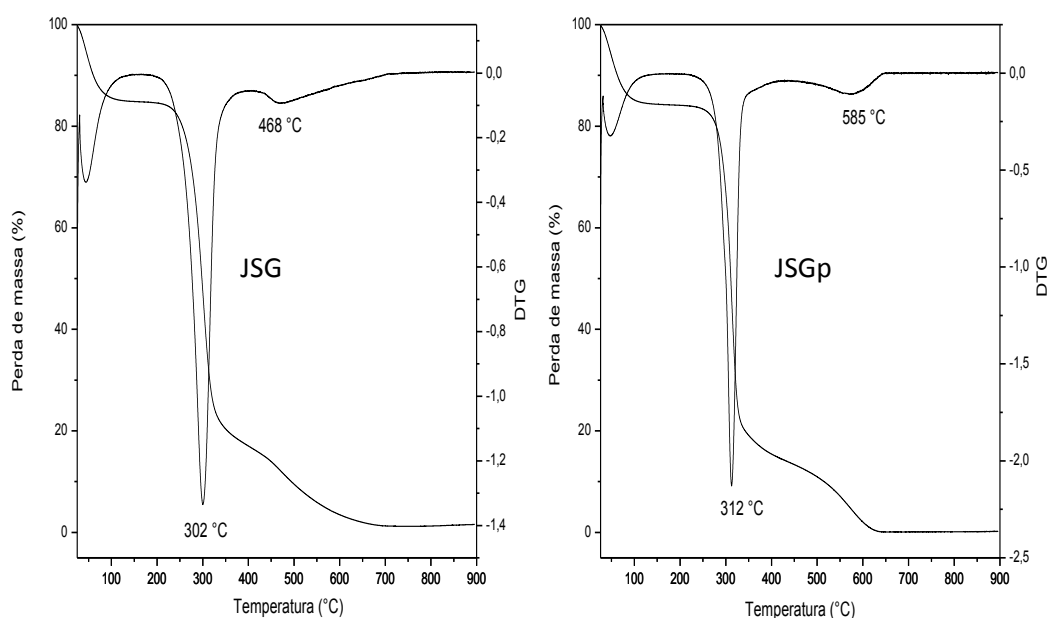


Tabela 6 Curvas de TGA e DTG mostrando as principais etapas de degradação da cadeia principal em temperatura acima de 100 °C, porcentagens de perda de massa e massa residual das membranas analisadas.

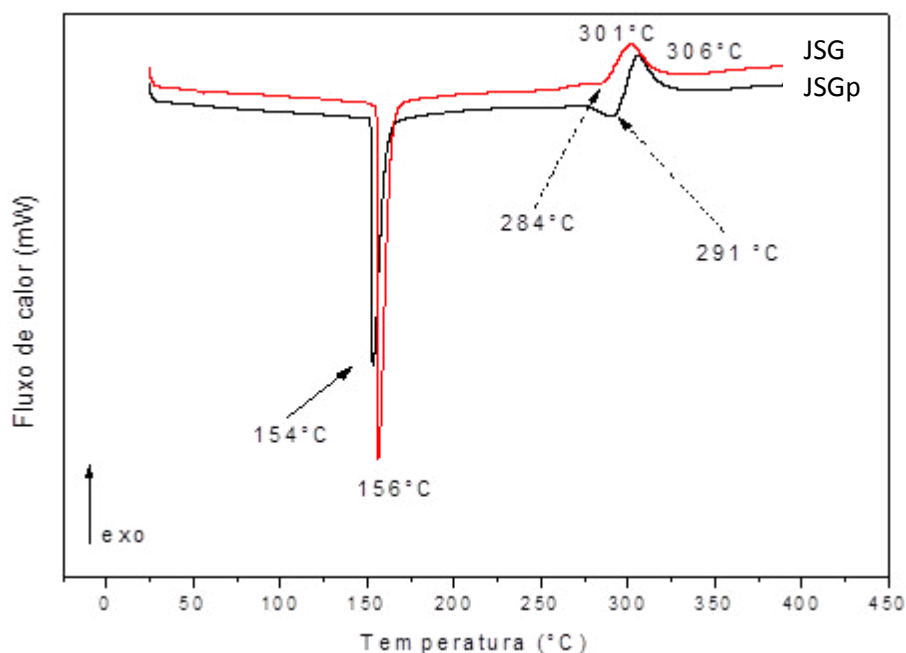
Amostras	1º estágio de Degradação (°C)	% Perda de massa	2º estágio de Degradação (°C)	% Perda de massa	% Massa residual a 900 °C
JSG	156,0	15,14	302	68,36	1,53
JSGp	154,0	16,02	312	69,23	0,01

Fonte: autor

4.5 Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC) da JSGp

As amostras de JSG e JSGp foram analisadas também através das curvas de Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC) Figura 8, que foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 110°C, em célula calorimétrica, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 ml min⁻¹). O aquecimento foi realizado em uma taxa de 10°C min⁻¹. O equipamento utilizado para esta análise foi um DSC 50 da empresa Shimadzu. Observam-se no termograma DSC da JSG (Figura 18) duas transições: a primeira é resultado da desidratação do material, com um pico endotérmico em 156°C, correspondente aos grupos funcionais hidrofílicos da JSG; a segunda correspondente à decomposição do material orgânico, com um pico exotérmico em 301°C. No termograma da JSGp, observa-se um pico endotérmico em 154°C, relativo à perda de água intramolecular, e outro exotérmico, em 306°C, correspondente à decomposição da cadeia polimérica. Tanto a JSG quanto a JSGp, depois do processo de purificação, apresentaram um pequeno pico endotérmico em 284 e 291°C, respectivamente (Figura 19). Esses eventos estão relacionados à estabilidade térmica do material, uma vez que se constata uma maior absorção de energia de 93,46 J/g na JSGp enquanto que para JSG, foi de 65,43 J/g, corroborando os dados de TGA.

Figura 8. Curvas de DSC das galactomananas de jucá.

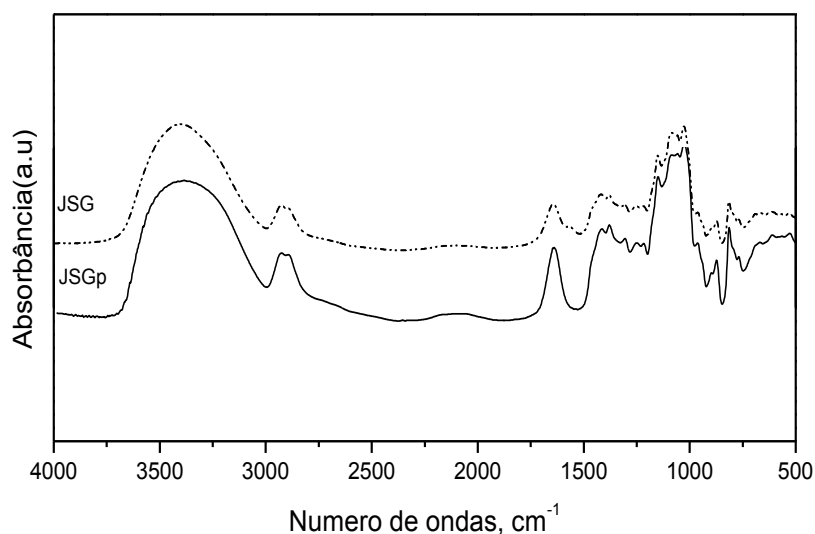


4.6 Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR) das amostras de JSG, JSGp e JSGs.

4.6.1 Etapas da purificação analisadas por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR).

A figura 9 mostra os espectros da JSG e da JSGp. Através desses foi observado que durante o processo de purificação, em sua estrutura básica, não foi constatado perdas relevantes da galactomanana, por exemplo, a degradação do polímero, que poderiam afetar, drasticamente, nas suas propriedades físico-químicas. Após a purificação da JSG ela apresentou uma melhoria na intensidade das bandas espectrais de um modo geral. No espectro da JSGp observamos as bandas de 3423 e 2921 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento vibracional O-H e C-H. Em 1640 cm^{-1} observa-se o estiramento assimétrico correspondente a ligação C-O (Aimin et al, 2011). Nessa região há uma similaridade com o espectro de FTIR de ambas as amostras de JSG e JSGp. As bandas em torno de 1151 a 1129 são de grupo C-O do anel piranosídico da JSG e JSGp. Cerqueira et al (2011) observaram que a região entre 1198 a 983 cm^{-1} está relacionada ao estiramento vibracional de C-O em ligações do tipo C-O-H. Foram observadas, também bandas em 872 e 815 cm^{-1} , relacionadas a ligações anoméricas dos grupos β -D-manopiranoses e α -D-galactopiranoses, respectivamente. Essas duas bandas espectrais comprovam a coexistência de α e β ligações glicosídicas do polissacarídeo JSGp (Albuquerque et al, 2014).

Figura 9. Aspecto geral dos espectros de FTIR da JSG e da JSGp

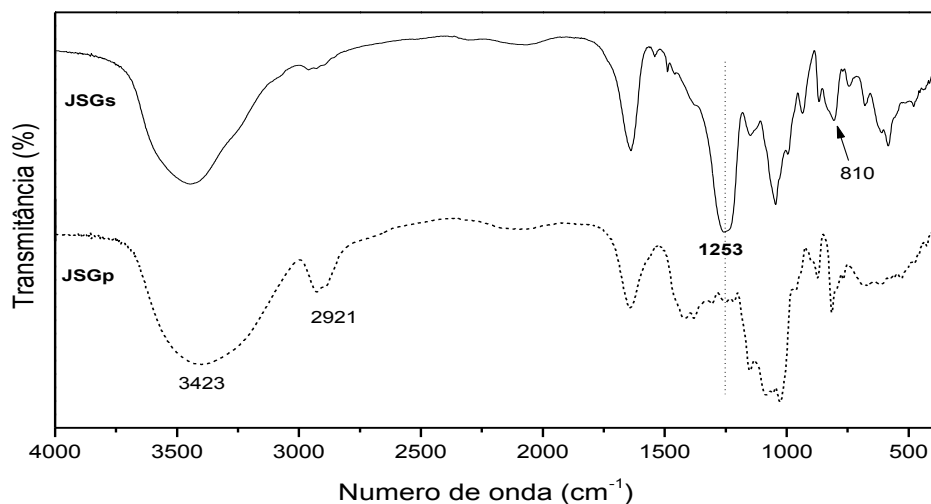


4.6.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR) da amostra JSGs.

Na figura 10, o espectro de FTIR da JSGs mostra as bandas em torno de 3423 cm^{-1} e 2921 cm^{-1} referentes aos estiramentos vibracionais de hidroxilas e C-H, respectivamente. Devido ao aumento do grau de substituição por sulfatação do polímero, a intensidade da banda de 2921 cm^{-1} se apresenta diminuída e deslocada. Na região da impressão digital do polissacarídeo, onde a intensidade da banda de 1253 cm^{-1} se encontra aumentada corresponde ao estiramento assimétrico do grupo S=O em 810 cm^{-1} corresponde a vibração da ligação C-O-S, que é atribuída a substituição do sulfato no carbono seis da galactose (Peymanet.al, 2011). As bandas entre 800 a 850 podem ser referidas a posição de sulfatação no anel de galactopiranoses. Assim, valores das bandas de 845, 830 e por volta de 820 são atribuídas, respectivamente, a sulfatação de C3, C2 e C6 de galactose (Wang et al, 2012; Barros et al, 2013). Por ser extremamente rápida e de fácil obtenção dos espectros, a técnica de FTIR se mostrou eficiente para a monitoração da reação de sulfatação nesse trabalho. Wang et al (2012) utilizando o mesmo ácido, em diferentes proporções de goma guar, com tempo de reação e protocolo metodológico diferente, obteve graus de sulfatação variando de 0,617 a 0,989. Jung et al (2011) demonstrou que o aumento da bioatividade biológica de

polissacarídeos sulfatados era proporcional ao aumento do grau de sulfatação do polímero estado. Nesse trabalho, obteve-se um percentual de 14,78% de enxofre e um DS de 1,19, sendo esperada uma boa atividade antiviral testada.

Figura 10. Região do espectro de FTIR da JSGp e JSGs e as atribuições da substituições no carbono-6 da galactose.



4.7 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de JSGp e JSGs

Na Tabela 7 observam-se os cromatogramas de GPC para as galactomananas JSGp e JSGs. Os valores da massa molar (M_w) para JSG e JSGp, analisados no presente trabalho, foram próximos dos encontrados na literatura, onde foram obtidos valores de massa molar na faixa de $7,00 \times 10^5$ a $3,05 \times 10^6$ g/mol (Andrade e Azero, 2000; Torres, Hallmark e Wilson, 2014), sendo a variação de massa dependente da espécie e do processo de extração e purificação do polímero natural. No derivado sulfatado (JSGs) ocorreu uma redução nos valores de M_w , em relação ao seu respectivo polímeros sem modificação química, JSGp, o que deve ser atribuído a quebra do polissacarídeo durante a reação de sulfatação. O aumento na degradação com o aumento do grau de Sulfatação (GS) também foi observado na sulfatação de galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* (Wang *et al.* 2013). As galactomananas de jucá apresentaram-se, através dos resultados dos cromatogramas, como um polímero de natureza amorfa com uma polidispersividade peculiar. Após o processo de sulfatação, o polímero apresentou uma redução de polidispersividade e uma massa molar menor, resultando na diminuição da viscosidade, após este processo (Tabela 7).

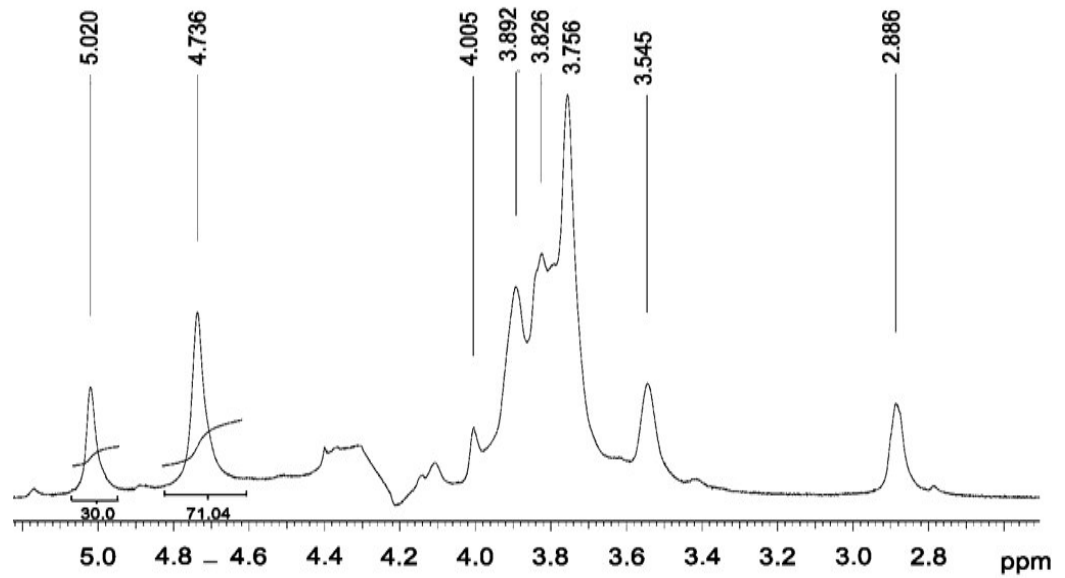
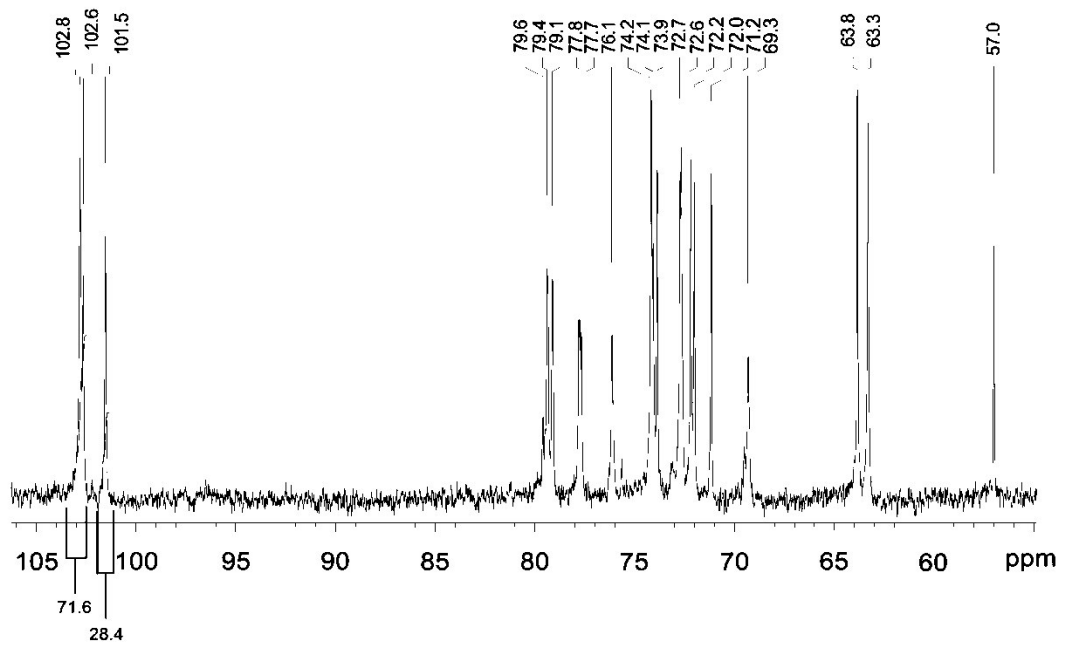
Tabela 7. Massas Molares de JSG , JSGp e JSGs.

Amostras	M _w (g/Mol)	M _n (g/Mol)	M _w /M _n
JSG	4,01 x 10 ³	0,843 x 10 ³	4,76
JSGp	3,61 x 10 ³	1,57 x 10 ³	2,29
JSGs	4,8 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	1,20

Fonte: autor

4.8 RMN ¹H e RMN ¹³C da JSGp: razão M/G

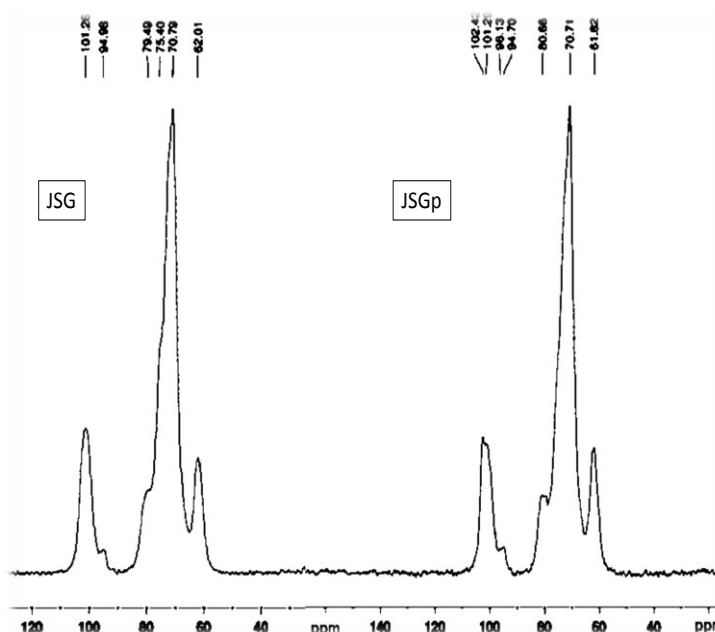
A espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C é um método eficiente para analisar as características estruturais dos polissacarídeos. O Espectro de RMN de ¹H do polissacarídeo (JSG) mostrou sinais (δ 4.736 and δ 5.020 ppm) correspondentes aos prótons anoméricos de β -D-manose e α -D-galactose, respectivamente. A região anomérica de ¹³C RMN (δ 102,8-101,5 ppm) foi atribuída a L-1- α -D-galactopiranosil, δ 101,5 ppm (por resíduo G1), M-1- β -D-manopiranosil, δ 102,8 ppm (por resíduo M1) e M-1- β -D-manopiranosil ramificada em O-6 δ 102,6 ppm (residual L-M1) (Souza, Ferraz & Sierakowski, 2010). Outros deslocamentos químicos de carbono (C2 a C5) e hidrogênio (H2 a H5) de JSG são resumidos nas Figuras 11 e 12. Eles estão em conformidade com os relatados na literatura (Ganter, et ai, 1994; Gong et al 2011 ; Albuquerque et al, 2014; Buriti et al 2014; Pawar & Lalitha, 2014). Através da integração relativa aos sinais 4.736 e 5,020 ppm no RMN de próton e os sinais 102,8 (102,6 ppm) e 101.5 ppm no RMN de carbono, na Figura 12, foi calculada a razão de manose e galactose (Man/Gal) da JSG. A razão Man/Gal obtida foi de 2.4:1 e 2.5:1, e deu-se através das integrações relativas das áreas dos sinais correspondentes a manose e galactose em ambos os espectros de RMN de hidrogênio e carbono (figura 11 e 12). Os valores observados para a JSG presente nesse trabalho estão coerente com as razões Man:Gal em outras galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* (razão 2.7:1), *Senna multijuga* (razão 2.3:1), *Caesalpinia cacalaco* (razão 2.5:1), *Gleditsia amorphoides* (razão 2.5:1) e *Cocos nucifera* (razão 2.57:1) (Srivastava & Kapoor, 2005; Prajapati et al, 2013). Pela substituição das galactoses na cadeia de manose, ocorre o aumento da solubilidade devido à posição espacial das hidroxilas das galactose (cis-OH), que induz o impedimento estérico das moléculas pertencentes a própria malha polimérica e conseqüentemente, possibilita a sua interação com mais moléculas de água, formando ligações de hidrogênio, portanto, deixando a JSG mais solúvel (Parajapati et al, 2013, Cerqueira et al, 2011).

Figura 11. RMN ^1H da JSgp e a razão M/G.Figura 12. RMN ^{13}C da JSgp e a razão M/G.

4.9 Espectro de RMN ^{13}C CP-MAS (Rotação do Ângulo Mágico de $54,7^\circ$ em polarização cruzada)-estado sólido de JSG e JSGp

Os sinais em 101,26 e 101,29 ppm, observados na Figura 13, estão relacionados ao carbono C1 da manose na JSG e JSGp respectivamente. Os sinais em 94,98 e 94,70 ppm estão relacionados ao carbono C1 da galactose na JSG e JSGp respectivamente. Na região entre 60 e 85 ppm (Figura 13) predominam dois sinais em 79,49 ppm para JSG e outro em 80,66 ppm para JSGp respectivamente. Estes sinais são atribuídos aos diferentes carbonos do anel piranosídico de manose, assim como das cadeias laterais de galactose. Os sinais situados em 62,21 ppm na JSG e 61,82 ppm na JSGp (Figura 13) são atribuídos ao carbono C6 da manose e da galactose, respectivamente. A Ressonância Magnética no Estado Sólido constitui uma alternativa para obtenção de espectros de polissacarídeos, que muitas vezes são de difícil solubilização e requerem o uso de solventes caros (Yang & Zhang, 2009).

Figura 13. RMN ^{13}C CP-MAS das GMN e GMB



4.10 Viscosidade intrínseca das JSGp e JSGs

De acordo com os resultados experimentais da viscosidade intrínseca foi observado que, à temperatura de 25°C houve uma redução da massa molar viscosimétrica e

na polidispersividade após o processo de sulfatação da galactomanana de jucá (Tabela 7). Utilizando os valores de (k) e (a), segundo Sousa et al 2010, foi possível obter valores de massa molar para JSGp e JSGs de $5,4 \times 10^5$ e $4,3 \times 10^5$ respectivamente (Tabela 8). Foi possível observar também que o valor de viscosidade intrínseca, $[\eta]_{red}$, para JSGp e JSGs foram de 167,2 dL/g e 132,2 dL/g, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Análises das Propriedades viscosimétricas das JSGp e JSGs

Amostras	$[\eta]$	$K^a (10^{-3}) (mL/g)$	a^b	$Mv (g/mol)$
JSGp	167,2	0,49	0,63	$5,4 \times 10^5$
JSGs	132,2	0,49	0,63	$4,3 \times 10^5$

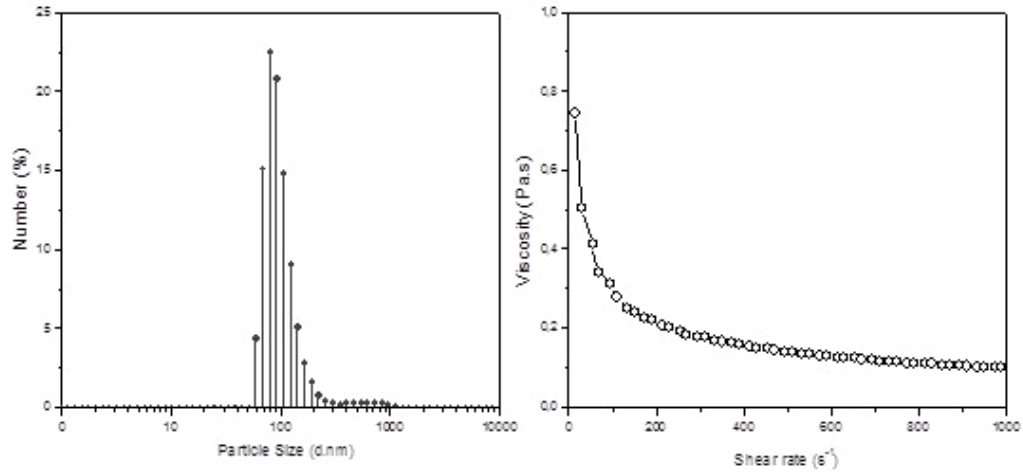
(a) constante de Mark-Houwink e (b) constante de Huggins.

4.11 Análise das propriedades moleculares: Potencial Zeta(ζ), Tamanho de partícula e viscosidade

Através do potencial zeta, foi possível medir a magnitude da repulsão ou atração entre as partículas da JSG em suspensão, o que determina a estabilidade da solução produzida com o polímero em estudo. Nos resultados da análise do potencial zeta não são mostrados os histogramas, mas a sua determinação foi conduzida em triplicata, apresentando um único pico, monomodal, dando um valor de -7.87 mV, o índice de polidispersividade foi de 2.29 e uma massa molar de 3.6×10^5 g/mol (tabela 7), estando em conformidade com os valores obtidos pela viscosidade intrínseca $5,4 \times 10^5$ g/mol (Tabela 8). Valores similares foram encontrados para a mesma galactomanana desse trabalho, e outras com métodos de extração e purificação diferentes (Souza et al, 2010; Cunha et al, 2005, Vendruscolo et al, 2009). A JSG apresenta tendência a agregação macromoleculares, devido a suas numerosas ligações de hidrogênio intermoleculares, principalmente quando solubilizado em água (Li et al, 2006). Essa característica observada em galactomananas está relacionada a polidispersividade desses polímeros. Agregados são inevitáveis em soluções aquosas de galactomananas, pois ocorrem ligações de hidrogênio inter ou intra moleculares. As cadeias laterais de galactose, sua substituição em cadeias de manose e os grupos de hidroxilas existentes são fatores indutivos para maior ou menor quantidade e tamanho dos agregados (Wang & Somasundaran, 2007, Oliveira et al, 2014). Observa-se que o modelo matemático da Lei da potência, para avaliar o

comportamento reológico da solução de 1% de JSG a 25°C, foi adequado para obtenção dos parâmetros como o índice de consistência (K), que na qual apresentou um valor de 2.63 (Pa.s)ⁿ, o índice de fluxo (n) que exibiu um valor de 0.52 e a viscosidade aparente da JSG que foi de 0,18 Pa. A partir dos resultados da figura 14, foi observado que a viscosidade inicial decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento, significando que apesar da tendência da galactomanana formar agregados, essas interações são desfeitas quando submetidas a forças cisalhantes, exemplo, o movimento peristáltico no intestino. Essa queda brusca da viscosidade à ação de forças cisalhantes revela a tendência pseudoplástica, característica de polímeros do tipo galactomanana (Figura 14). De fato, de acordo com Steffe (1996), quando o valor de K é maior que zero e o valor de n está entre o intervalo $0 < n < 1$, o fluido é considerado não-Newtoniano, recebendo a denominação de fluido pseudoplástico, apresentando uma alta viscosidade. Essa característica corrobora o fato de apesar da tendência aos enrosco da malha polimérica, a galactomanana consegue abranger uma área superficial maior quando submetida a forças cisalhantes. JSGp apresentou uma D (3,2) no valor de 4,3µm (maior superfície de área de 9,74 m² / cc) e um maior número de partículas de tamanho de cerca de 100 nm, aparência monomodal, quando numa solução a 0,1% (w / v). Avaliando o diâmetro da partícula D(3.2), e correlacionando à área ao seu volume, deduz-se que a área em detrimento ao volume da JSG, tende a aumentar, quando esse volume diminuir, portanto, é esperado que a medida que essa malha polimérica se estenda, possivelmente terá uma maior tendência em aumentar a superfície de contato. Resultados similares foram encontrados por Huang et al (2001) com soluções hidrocoloides de galactomanana de *Trigonella foenum-graecum*, obtendo valores de área superficial de 8.31m²/cc, atribuindo como sendo uma grande área superficial.

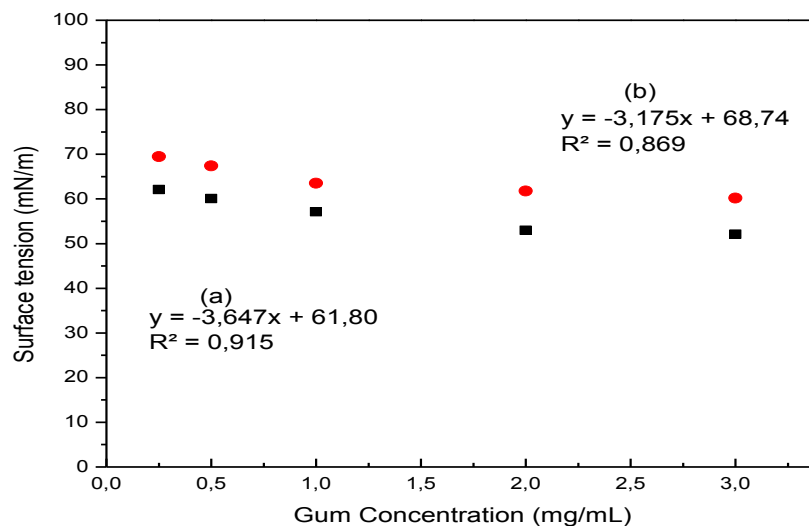
Figura 14 O tamanho das partículas, a reologia do JSG, respectivamente: (i) mostra a forma de partículas monomodal com um valor médio de 100 nm; (II) o gráfico de reologia a diminuição observada da viscosidade com o aumento da velocidade de corte, típica de comportamento pseudoplástico das JSG



4.12 Tensão superficial

O aumento da concentração de JSG entre 0,025% e 0,3% a 25 °C conduz a uma diminuição moderada na tensão superficial da água (72 mN/m) de 61,80 e 68,74 mN/m, respectivamente, JSGp (a) e JSG (b) (Figura 4). Esses valores estão em concordância com aqueles relatados para dispersões de algumas gomas em água (Garti, Slavin & Aserin, 1999; Moreira et al 2012). A goma de guar tem sido descrita como uma das principais estabilizantes e espessantes na indústria de alimentos, com uma capacidade para reduzir a tensão superficial da água para 60 mN / m, quando em concentrações de cerca de 0,5% (Wu et al., 2009). No presente estudo, a tensão superficial da água foi reduzido para 60 mN / m por uma solução a 0,3% JSG (m / v), após purificação (Figura 15).

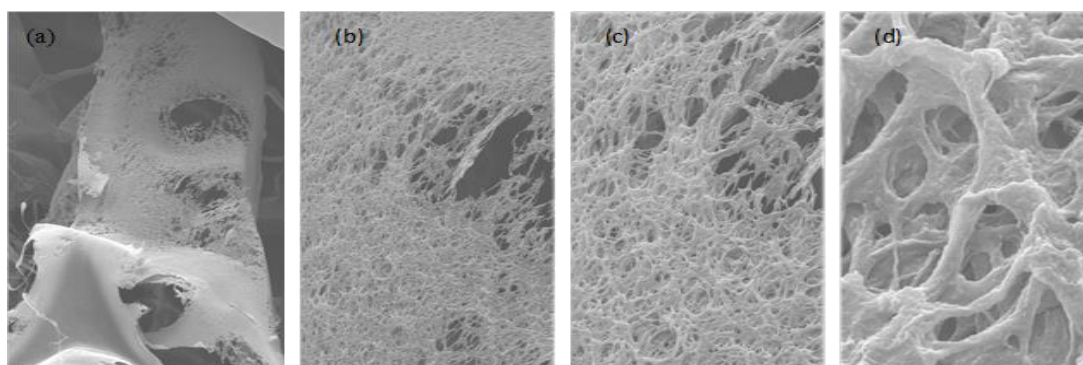
Figura 15 Valores da diminuição da Tensão Superficial da água pela JSG e JSGp.



4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da JSGp.

Pelas micrografias geradas pelo MEV da JSGp, Figura 16. em aumento progressivo de 1000x a 50000x, foi possível avaliar seu aspecto morfológico. Em (a), correspondente a um aumento de 1000x, é constatado que a JSGp após liofilização, apresenta um aspecto de uma malha lisa e uniforme de cor branca e aveludada. Nas ampliações das micrografias (b), (c) e (d), com aumentos de 5000x, 10000x e 50000x, respectivamente, foi possível visualizar melhor a formação de várias malhas sobrepostas aleatoriamente, constituídas de poros com diâmetros aproximadamente semelhantes e depositadas em camadas que se entrelaçam, formando uma emarenhada rede fibrilar do polímero, que em maior aumento tem um aspecto de terraço liso e aveludado, sendo essa morfologia corroborada pelas micrografias de Força Atômica.

Figura 16 Micrografias de MEV em aumento progressivo, mostrados em (a), (b), (c) e (d), da JSGp, com aumentos de 1000x, 5000x, 10000x e 50000x, respectivamente.



4.14 Microscopia Força Atômica (MFA) da JSG, JSGp e JSGs.

Na figura 17 observa-se a micrografia em 3D, em escala de altura de 3 μm , da JSGp, caracterizada por uma rede polimérica entrelaçadas, de alturas variadas, que corroboram com a sobreposição de camadas, visíveis em outras micrografias de MFA e MEV. A figura 18 apresenta, também, a sobreposição dessas camadas, em micrografia em 3D, numa escala de altura de 200 nm, da JSGp, mostrando camadas de alturas em cores diferentes, sendo que, quanto mais escura for a coloração, mais profunda é a região apresentada. Na figura 19 apresenta-se a micrografia da JSGp, bidimensional, numa escala de altura de 500 nm, revelando que essa sobreposição de camadas formam verdadeiros terraços, em camadas superficiais e em camadas mais profundas, tem uma formação em espiral. A figura 20 representa, em 3D, a JSGs, apresentando uma descontinuidade da rede polimérica em

comparação com a JSGp, antes da sulfatação (b). Ambas as micrografias estão na mesma escala de altura de 50 nm. O polímero sulfatado apresenta uma morfologia formada estruturalmente por pedaços semelhantes e uniformes quando comparada à morfologia da JSGp, que apresenta uma estrutura densa, com pedaços de polímeros variados. Essas observações estão de acordo com a polidispersividade apresentada pela técnica de GPC, onde se percebe uma homogeneidade dos fragmentos na JSGs, portanto, menos polidispersiva que a JSGp. A figura 21 apresenta as micrografias da galactomanana de jucá purificada e sulfatada. Pela micrografia da JSGs observou-se um aspecto esponjoso e um aumento, tanto em diâmetro como em quantidades de poros da galactomanana. Na micrografia da JSGp, em fases, observou-se um aspecto denso e sem porosidade aparente, na mesma magnitude de ampliação. O aspecto poroso, com aumento do diâmetro dos poros da JSGs, se deve a degradação parcial da cadeia polimérica, que apresenta uma descontinuidade superficial, ocorrendo o aparecimento de cavidades mais ou menos uniformes, por toda área superficial do polímero modificado. Essa mudança corrobora com as mudanças nas propriedades físico-químicas do polissacarídeo, que apresenta uma menor massa molar e viscosidade intrínseca. Além disso, as JSGs não formam géis firmes, quando se compara com o seu polímero JSGp. Por meio das imagens obtidas da JSGp, no início e final do processo de purificação (Figura 22), observamos que o aspecto morfológico da galactomanana após o processo de purificação é mais homogêneo, uma vez que todas as imagens possuem mesma escala de altura (500 nm), o que sugere que as regiões mais altas (pontos escuros) observadas nas imagens antes e depois do processo estejam relacionadas com impurezas e/ou pigmentos.

O aspecto morfológico das JSG (Figura 17) é mais homogêneo após purificação, uma vez que todas as imagens apresentam a mesma dimensão de altura (300 nm), o que sugere que as regiões mais elevadas presentes antes da purificação foram relacionados com impurezas e/ou pigmentos. Assim, o método de purificação foi eficaz para remover as impurezas da superfície (Lubambo et al, 2013). A MFA micrografia mostra a formação de uma rede polimérica, possivelmente por causa da tendência do polímero em solução para esticar as suas cadeias, promover expansão e uma maior tendência para aumentar a superfície de contacto com outros polímeros (Wang & Somasundaran, 2007). Isto possivelmente no controle da diabetes, torna a JSGp disponível para interação com amido, diminuindo a eficiência do α -amilase, que elevaria os níveis de glicose no sangue. Deste modo, esta formação da rede e a tendência para a agregação e alongamento, sucessivos podem ser relacionadas com a restrição da difusão da glicose a partir do intestino para o sangue. Além disso, essa propriedade de

gelificação ajuda a diminuir lesões em feridas, pois, em superfícies irregulares ela se amolda ao relevo, possivelmente aumentando a área de superfície, em caso de feridas abertas, protegendo contra ressecamento e abertura de novas feridas.

Figura 17. Representa a micrografia em 3D, em escala de altura de 3 μm , da JSgp, mostrando uma rede polimérica entrelaçadas característica

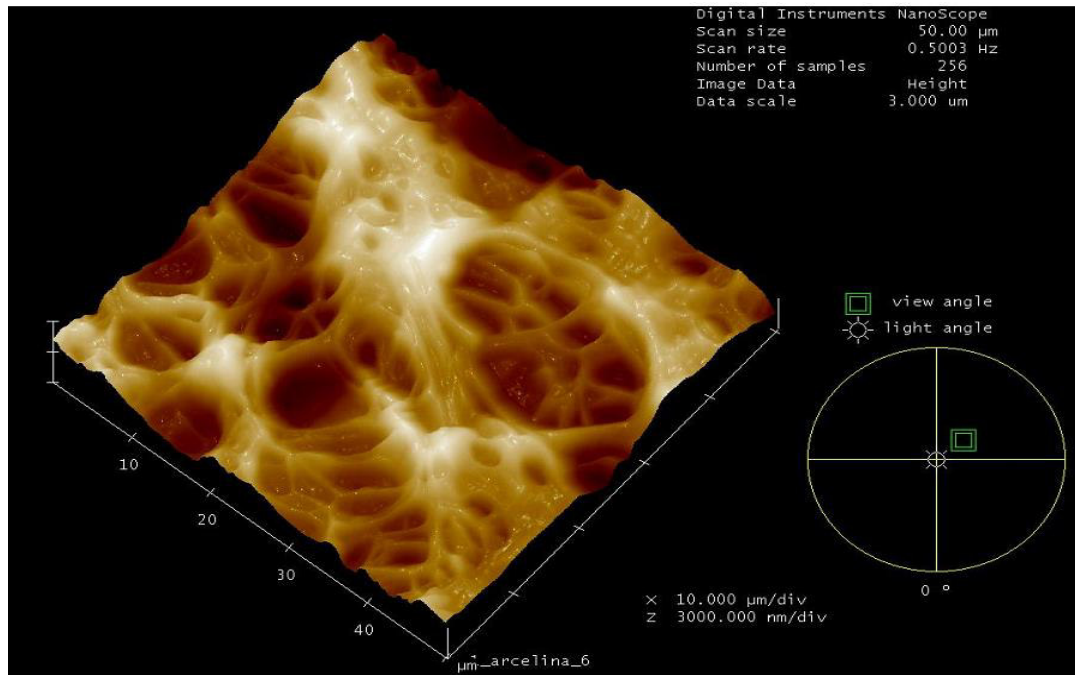


Figura 18. Representa a sobreposição de camadas, representada por uma micrografia em 3D, numa escala de altura de 200 nm, da JSgp

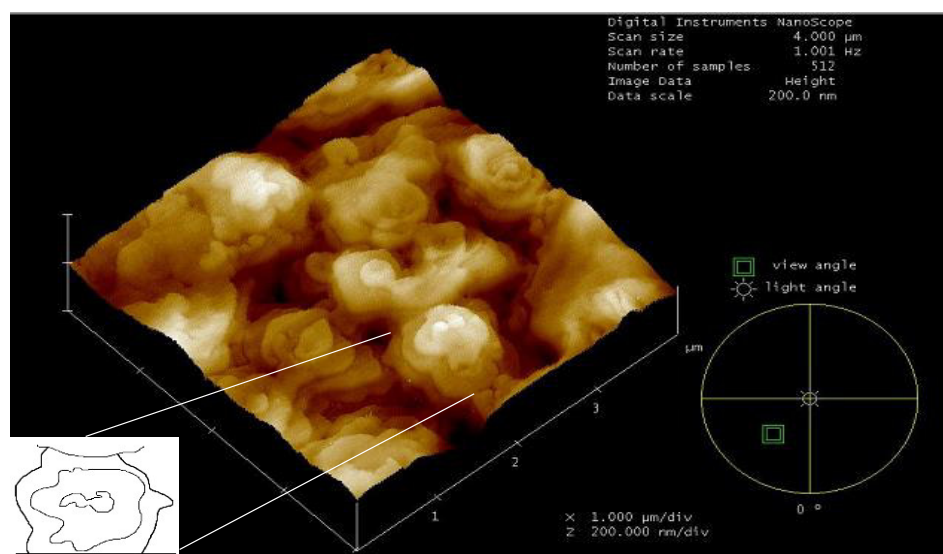


Figura 19. Micrografia bidimensional, em 500 nm de altura da JSGp, onde nas regiões mais superficiais, mostram os terraços e nas regiões mais profundas exibe uma formação espiralada.

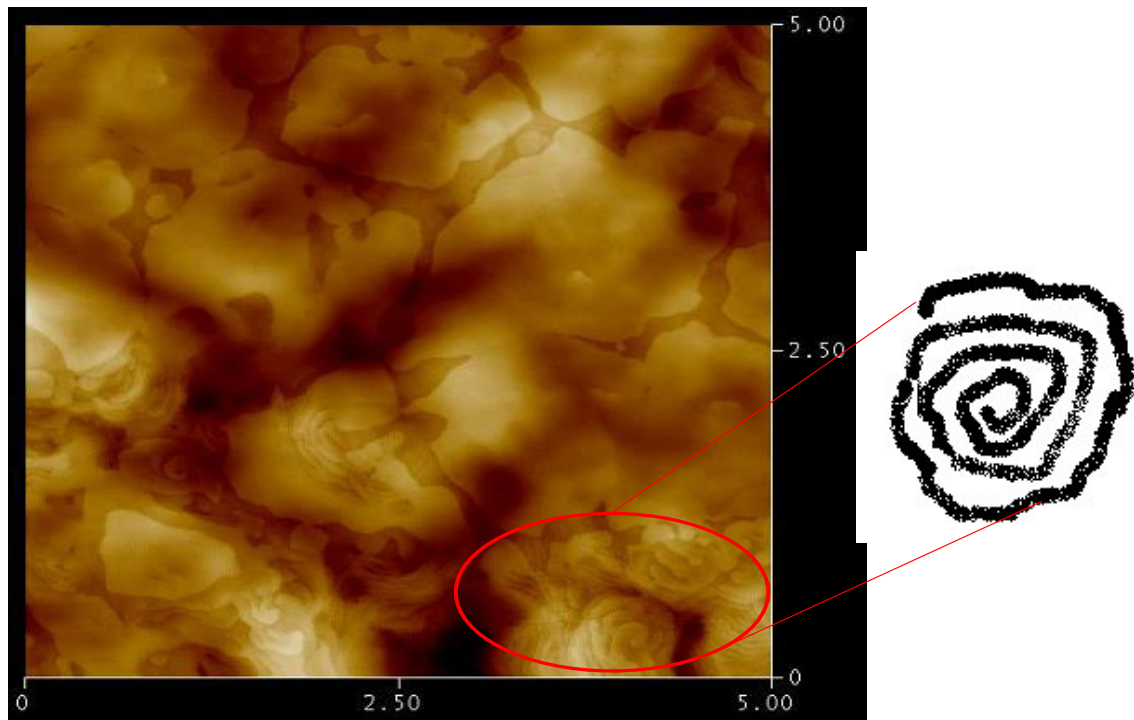


Figura 20. Micrografias em 3D de MFA, em escala de 50 nm, em que (a) e (b) representam, respectivamente, JSGs e JSGp.

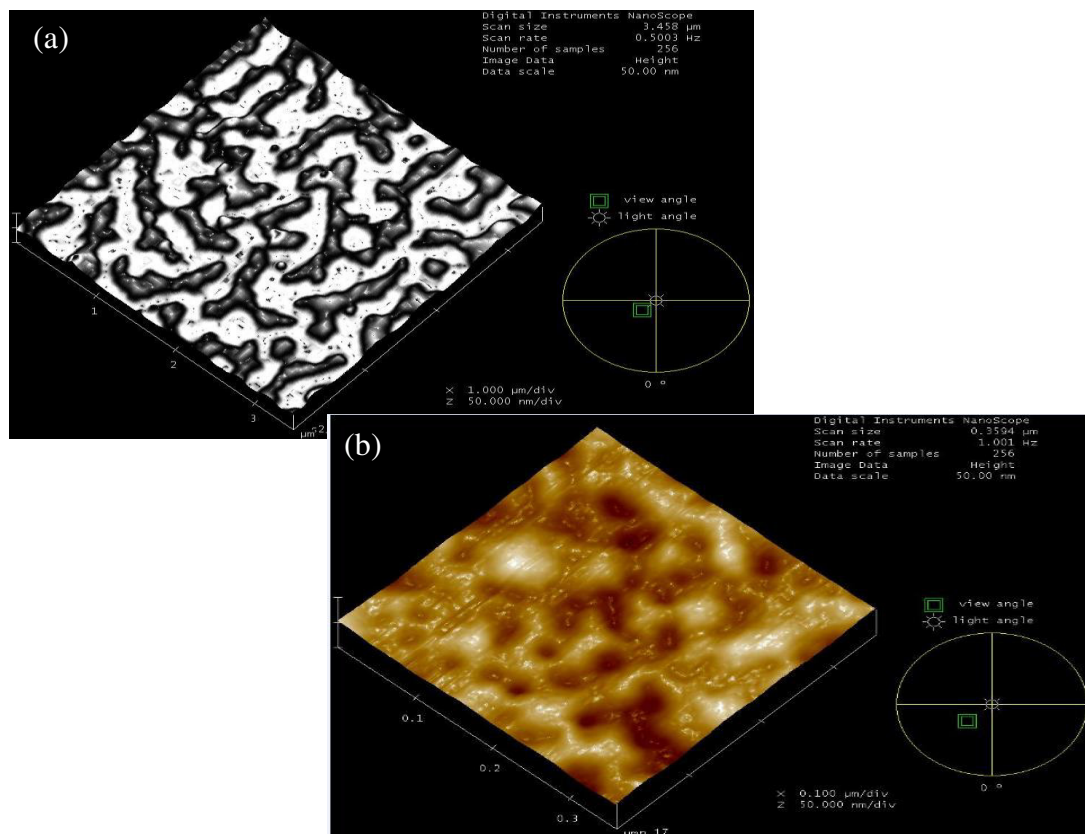


Figura 21. Diferenciação morfológica das JSGp e JSGs, através das micrografias obtidas por AFM

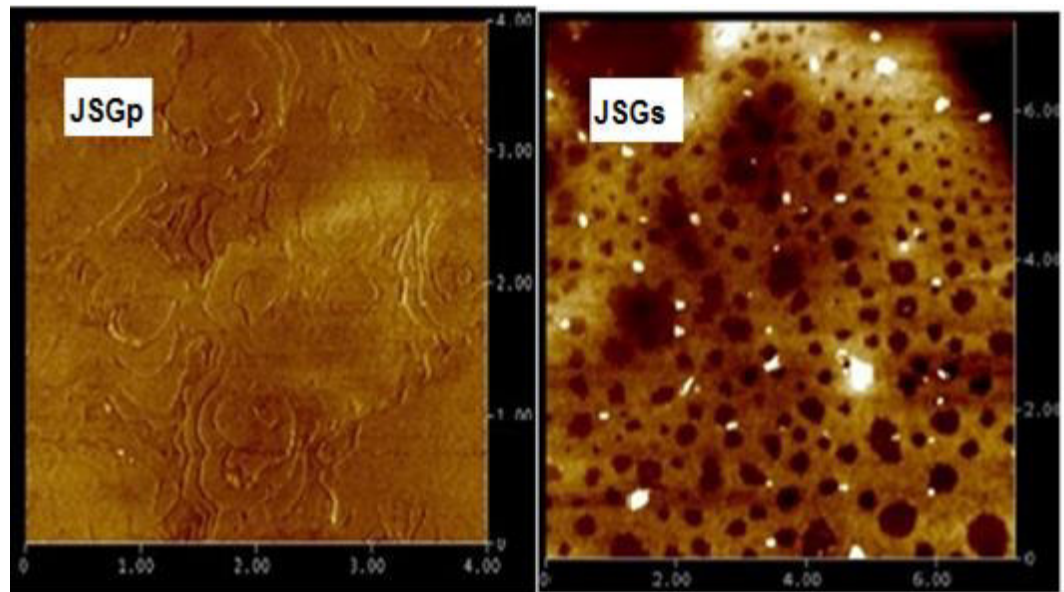
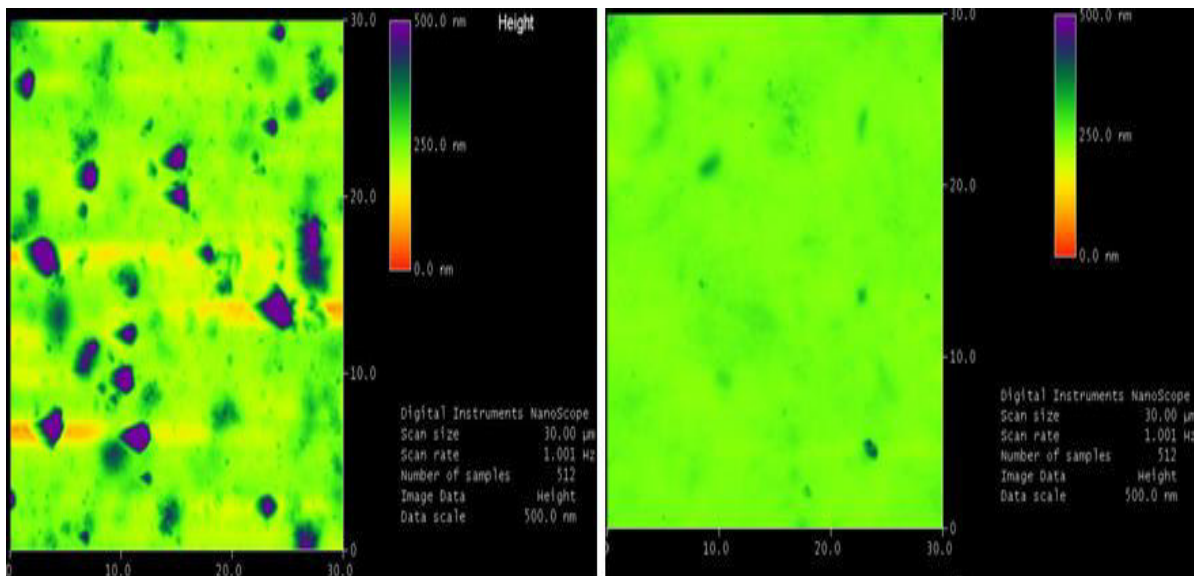


Figura 22. Micrografias obtidas por FMA das etapas inicial e final do processo de purificação da galactomanana de jucá



4.15 Atividades biológicas das amostras JSGp e JSGs

4.15.1 Teste de toxicidade da amostra JSGp em camundongos

O polissacarídeo de galactomananas JSGp apresentou $DL_{50} > 800 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ peso corpóreo. Mesmo a amostra ter causado mortes, esses valores de DL_{50} são considerados moderadamente tóxicos segundo os critérios de Hodge e Sterner (1949) Portanto, mesmo

quando injetadas numa via de rápida absorção como a via IP (intra peritoneal), a amostra não se mostrou muito tóxica para mamíferos, ou seja, com valores de $DL_{50} < 25\text{mg.Kg}^{-1}$ (Berezovskaya, 2003). Além disso, a amostra avaliada terá sua toxicidade bastante reduzida quando administrada em potencial por via de aplicação externa, o uso tópico (Tabela 9). O estudo preliminar *in vivo* em camundongos revelou que a amostra JSGp desenvolvida nesse trabalho tem toxicidade mínima quando aplicada numa via de rápida absorção como a via IP (intraperitoneal), onde o valor da DL_{50} foi abaixo de 25mg.Kg^{-1} , portanto sendo favorável ao uso tópico ou em mucosas.

Tabela 9. Classificação de substâncias tóxicas para administração subcutânea (SC) e peritoneal (IP) (Berezovskaya, 2003).

Classe de toxicidade	Características	$DL_{50}\text{mg/kg}$	
		S. C	I. P
1	Extrema toxicidade	= 0,3	= 0,2
2	Alta toxicidade	0,4 – 15	0,3 – 10
3	Moderada toxicidade	16 – 150	11 – 100
4	Baixa toxicidade	151 – 1500	101 – 1000
5	Praticamente atóxica	1501 – 4500	1001 – 3000
6	Relativamente sem dano	> 4500	>3000

4.15.2 Resultados dos testes sobre a bioatividade antiviral da galactomanana sulfatada de *Caesalpinia férrea* (JSGs) frente aos vírus do herpes simplex (HSV) e Poliovírus (PV)

4.15.2.1 Ensaio de citotoxicidade em células HEP2 e Atividade antiviral da JSGs

A concentração citotóxica 50 % (CC_{50}) de polissacarídeo sulfatado extraído de *C. ferrea* em células HEP2 foi determinada pelo ensaio de MTT. A Tabela 10 mostra o efeito de JSGs na replicação de HSV1 e PV1 e sua CC_{50} indicada como maior do que $3000\text{ }\mu\text{g/ml}$. Assim, muito baixa ou nenhuma toxicidade pode ser assumida para este composto.

JSGs inibiu HSV1 e PV1 com um IC_{50} de $405\text{ }\mu\text{g/ml}$ e $1,73\text{ }\mu\text{g/ml}$, respectivamente, e o índice selectivo (SI) de $> 7,4$ e > 1734 , respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. A concentração inibitória 50% (CI₅₀) de polissacarídeo sulfatado de C.ferrea (JSGs), aciclovir (ACV) e interferon (INF) para HSV1 e PV1 em células HEp2, por placas ensaio. Concentrações citotóxicas 50% (CC₅₀) e o índice de seletividade (SI) são também mostrados.

	CC ₅₀	HSV-1		PV-1	
		IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
JSGs	>3000	405	>7,4	1,73	>1734
ACV^a	2550	2100	1,21	NT	NT
INF^b	>1.000.000	NT	NT	472	>2118,6

NT Não Testado ;a: µg/mL; b: UI/ mL

4.15.2.2 Resultado da atividade anti-herpética

O polissacarídeo JSGs mostrou grande atividade antiviral para HSV1 quando adicionado simultaneamente com a infecção viral (tempo 0 h). A % VI foi de 100 % para 1000 e 1500 µg/ml, de 84,1 % para 750 µg/ml, de 70,8 % para 500 µg/ml, de 28,4% para 250 µg/ml. Para os tempos de 1 h e 2 h após a infecção, a % VI foi de 100 % para as duas maiores concentrações testadas (1500 µg/ml e 1,000 µg/ml). Por 750 µg/ml e 500 µg/ml, a inibição foi de 89 % e 39,1 %, respectivamente. Para o tempo de 1 hora. No entanto, não foi observada inibição para o tempo de 2 horas após a infecção ($p > 0,05$). O pré-tratamento inibiu apenas 11 % e 32 % quando o composto foi adicionado 1 h e 2 h antes da infecção, respectivamente, nas mesmas concentrações (1,000 µg/ml e 1,500 µg/ml), e com as concentrações mais baixas (750 µg/ml e 500 µg/ml) a JSGs não foi afetiva. A pré-incubação de suspensões de vírus com JSGs mostrou um efeito inibitório de 60 % na concentração de 1,000 µg/ml. Juntamente com a inibição da adsorção, a inibição de penetração também foi investigada. Os resultados demonstraram que o composto inibiu parte do vírus em 54 % e 77 % em concentrações de 1,000 µg/ml e 1,500 µg/ml , respectivamente , mas não foi capaz de evitar a penetração de HSV1 nas células ($p > 0,05$) em todos as concentrações testadas (Figura 23). A expressão de antígenos do HSV1 foi inibida na presença de JSGs nas concentrações de 500, 750, 1000 e 1500µg/ml de forma dose-dependente, representado a inibição de 42,6%, 72%, 88,5% e 100%, respectivamente. A propagação do HSV1 foi avaliada por meio de medição do tamanho de placas viral, e a os resultados mostraram que houve redução da propagação lateral da infecção nas concentrações de 500 e 750 µg/ml (Figura 24). Experimento para determinar se JSGs poderia inibir a síntese DNA do HSV foi realizada pela amplificação HSV1 ICP4 por PCR. A Figura 24 mostra uma redução total do DNA genômico viral na presença do composto a uma concentração de 150 µg/ml. O potencial sinérgico da JSGs com ACV para

HSV1 foi realizada utilizando quatro combinações diferentes de concentrações JSGs / ACV, 100/500; 200/1000; 400/2000 e 800/4000 $\mu\text{g/ml}$. Todas estas combinações inibiram 100% a replicação do HSV1 com uma $IC < 0,5$, demonstrando o efeito sinérgico.

Figura 23. A inibição de HSV1 por polissacárideo sulfatado de *C. Ferrea* (JSGs (%)) nos protocolos seguintes: (a) time of addition (-2 A +2); (b) a inibição da adsorção (IA); (c) inibição de penetração (PI) e (d) virucida (V) em culturas de células HEP2 pelo ensaio de redução de placas, nas concentrações indicadas. A percentagem de inibição viral (%VI) foi determinada em comparação com os controles, e os resultados são expressos como média \pm SD triplicado de experiências independentes.

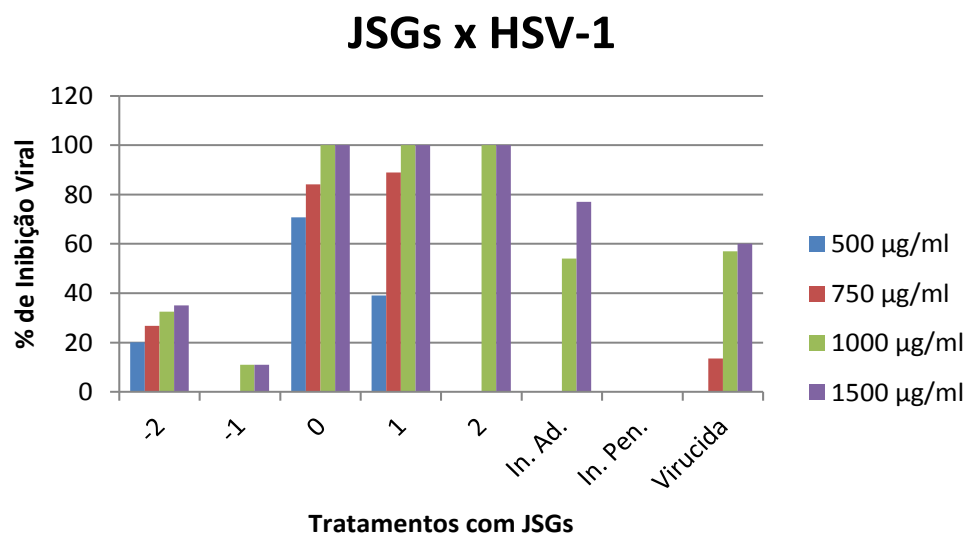
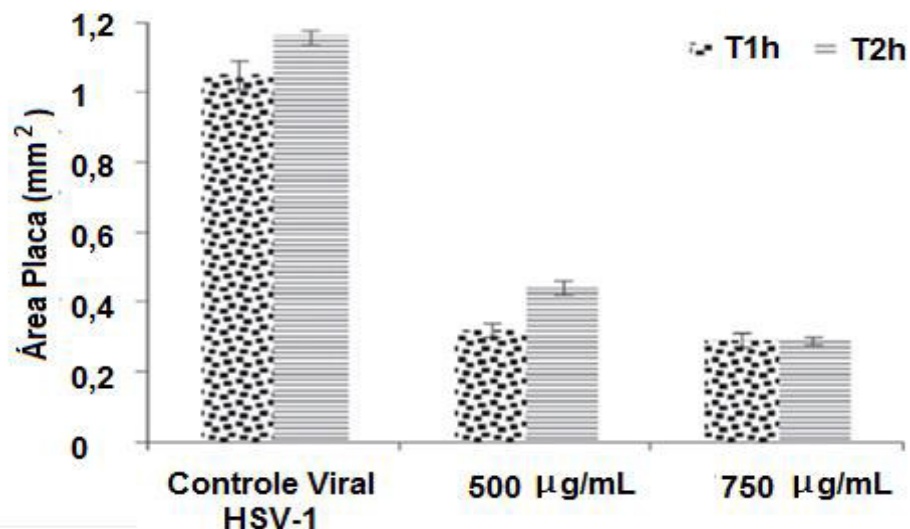


Figura 24. O efeito do polissacárideo sulfatado de *C. ferrea* (JSGs) sobre a placa área de HSV1. As culturas de células HEP2 foram tratadas com GMS nas concentrações de 500 mg/mL e 750 mg/mL , 1h e 2h após a HSV1 infecção. A área da placa foi determinada em comparação com os controles, e os resultados são expressos como média \pm DP de três experimentos.



4.15.3 Resultado da atividade Antipoliiovirus

A amostra JSGs mostrou maior atividade para PV1, quando adicionada em simultâneo com a infecção viral, em baixas concentrações (1,25-10 mg / ml) com o máximo de % VI, de aproximadamente, 90 % em 10 µg / ml. Quando o composto foi adicionado, antes e após, a inibição da infecção foi observado embora em uma % de VI menor que o tempo 0 h. A amostra JSGs inibiu o PV1 em cerca 10 % e 40 %, respectivamente, quando adicionado 1 h e 2 h antes da infecção ($p > 0$). Na mesma concentração, a inibição de penetração, a inibição da adsorção e o ensaio virucida foram respectivamente, % VI, 28 %, 38 % e 48 % (Figura.25). Por IFA JSGs demonstrou altas porcentagens de inibição das células fluorescentes, de 88% para 1,25 µg / ml, 94 % para 2,5 µg / ml e 100 % de 1000 e 1500 mg / ml, quando o tratamento foi realizado no tempo 0 h de infecção. RTPCR demonstrou que JSGs causou uma significativa inibição da síntese de RNA viral, como mostrado na Figura.26B, em a concentração mais elevada (10 µg / ml) e uma curva foi observada.

Figura 25. A inibição de PV1 por polissacarídeo sulfatado de *C. ferrea* (JSGs) (JSGs) (%) para os protocolos seguintes: (a) tempo de adição (-2a+2); (b) a inibição da adsorção (IA); (c) inibição de penetração(PI) e (d) virucida(V) em HEP2 culturas de células pelo ensaio de redução de placas, nas concentrações indicadas. A percentagem de inibição viral(% VI) foi determinada em comparação com os controles, e os resultados são expressos como média \pm SD três experimentos independentes.

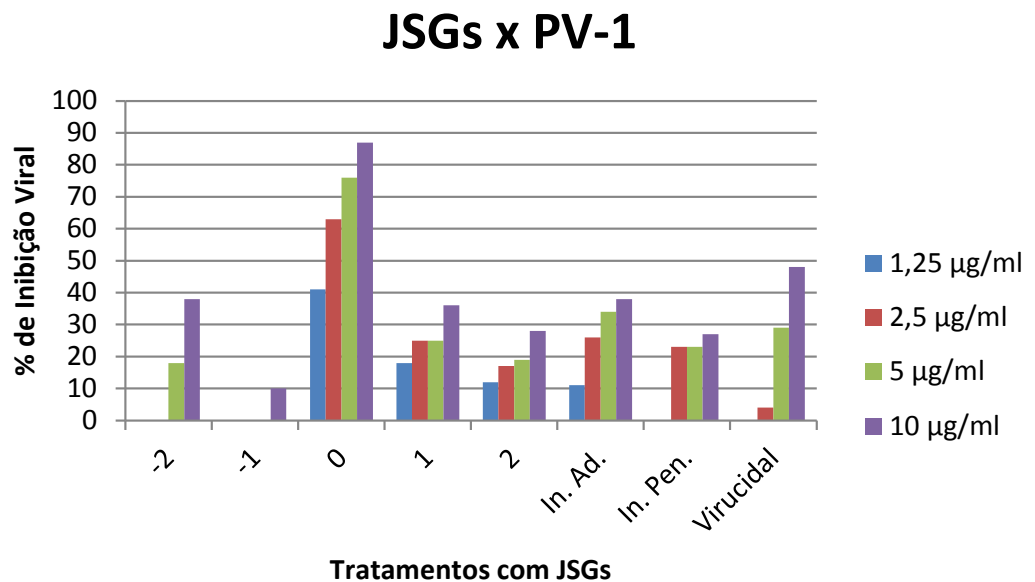
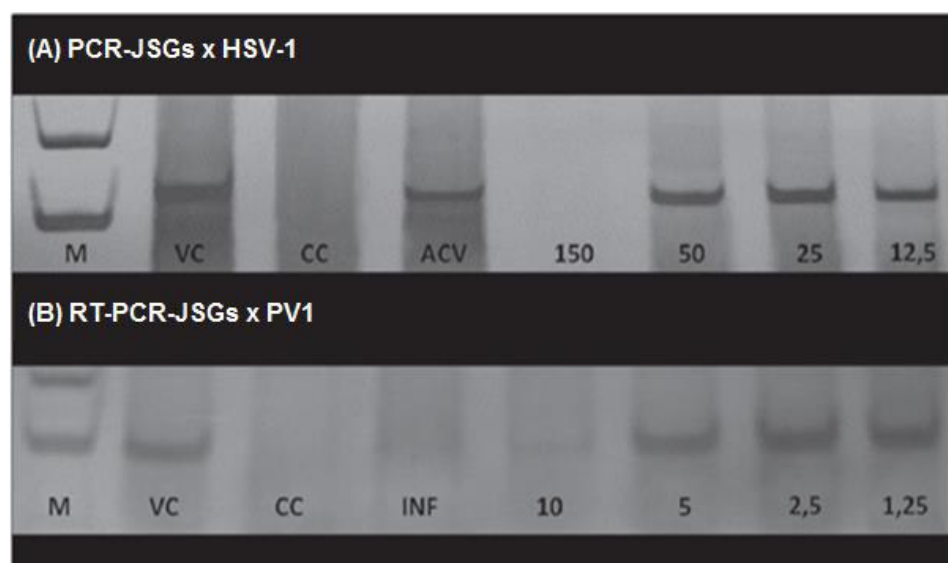


Figura 26. A inibição da síntese de ácidos nucleicos de HSV1 e PV1 por polissacarídeo sulfatado de *C. Ferrea* nas concentrações. Eletroforese em gel de poliacrilamida de (A) amplicon de PCR para HSV1 ICP4 (138pb) e (B)RT-PCR amplicon para PV1VP1-VP4 (102pb). MWDST (padrão do peso molecular). (M) e controles de vírus (VC); celular (CC); positivo inibidor (ACV e INF).



A inibição da síntese da proteína viral apresentado por IFA está em conformidade com os resultados obtidos por ensaio de redução de placa, que demonstrou que a JSGs inibe a replicação do HSV1, adicionado simultaneamente ou depois da infecção. O resultado desse estudo demonstrou que o polissacarídeo JSGs não interferiu com HSV1 em fase de penetração. O teste de PCR demonstrou uma inibição maciça na concentração de 150 µg/ml mostrando que a JSGs além do efeito anteriormente mostrado é capaz de reduzir a síntese de DNA viral. Sobre o efeito citopático de HSV1, descobrimos que JSGs reduziu significativamente a área da placa de HSV1. Constatando que a disseminação eficaz do vírus desempenha um papel importante na sua infectividade, a inibição da propagação célula a célula é um alvo atraente para novas drogas antivirais. A inibição da disseminação de HSV1 célula a célula é uma possibilidade, no entanto, a redução da replicação do vírus causada pelo JSGs não pode ser descartada. Recentemente, Cardozo et al. (2011) demonstraram a inibição da HSV célula a célula num polissacarídeo sulfatado *Agaricus brasiliensis* obtido a partir de micélio. Em relação ao efeito sinérgico de JSGs e ACV contra HSV1, os resultados demonstraram um efeito cooperativo sugerindo que JSGs pode ser usado sozinho ou em combinação com ACV para o tratamento da infecção. A inibição da replicação de PV1 ocorreu por um mecanismo semelhante ao encontrado por HSV1, no entanto, de forma mais eficaz em menores concentrações do composto. Similarmente, sugere-se a inibição em estágios iniciais da replicação de PV1 demonstrado pela inibição de penetração e adsorção de PV1 mostrando também efeito direto sobre partículas virais, como observado no ensaio virucida. Além disso, alguns estudos têm relatado o efeito antiviral de polissacarídeos sulfatados após a internalização do vírus na célula. Esses compostos poderiam interferir na síntese de proteínas virais (Biesert et al, 1990; Gonzalez et al, 1987). Os resultados demonstraram pelo ensaio de IF, uma elevada percentagem de inibição do número de células fluorescentes, o que confirma os resultados da placa ensaio de redução e sugerindo inibição na síntese de proteínas do PV1 dose dependente. Por outro lado, o RT-PCR demonstrou a inibição da síntese de RNA viral na concentração mais elevada (10 µg/ml) mostrando uma dose-dependente de inibição como na PRA. Este trabalho forneceu a primeira evidência experimental das propriedades antivirais de polissacarídeo sulfatado de solução aquosa de *C. ferrea* para HSV1 e PV1. Os resultados indicaram que a JSGs interfere em várias fases da replicação do ciclo de HSV1, principalmente na etapa de adsorção do vírus , assim como apresentando o efeito sobre as partículas de vírus e na expressão de proteínas virais. O efeito

inibidor do composto na replicação de PV1 foi mais significativo e interferiu nas etapas iniciais de replicação do vírus, como por exemplo, na etapa de adsorção viral e de penetração, e na síntese de proteínas virais em baixas concentrações. Os resultados sugerem que JSGs é um composto promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais.

4.15.4 Resultados dos testes sobre a atividade antidiabetes da galactomanana purificada de *Caesalpinia ferrea* (JSGp)

4.15.4.1 Teste de toxicidade da amostra JSGp em camundongos

4.15.4.2 Efeito do tratamento de galactomanana em ratos diabéticos

Os animais do grupo D (animais diabéticos) mostraram um peso corporal mais baixo em relação ao grupo G (animais tratados com galactomanana). O tratamento com galactomanana foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05$) a glicemia dos animais diabéticos após o início do tratamento em relação ao grupo D. No entanto, o tratamento com galactomanana não melhorou a tolerância à glicose em animais diabéticos como observado na curva glicêmica durante GTT (Figura 27 e 28). O peso do coxim de gordura EP de animais diabéticos tratados com galactomanana foi significativamente mais elevada do que de ratos diabéticos não tratados (Figura 29). O tratamento com galactomanana também foi capaz de reduzir significativamente os triglicéridos de animais diabéticos (Figura 28).

Figura 27. Massa corporea (A), Glicemia semanal (B), Teste oral de tolerancia de glicose (C) Ratos diabéticos tratados e não tratados com galactomanana. * $p < 0.05$, diabetes vs. galactomanana.

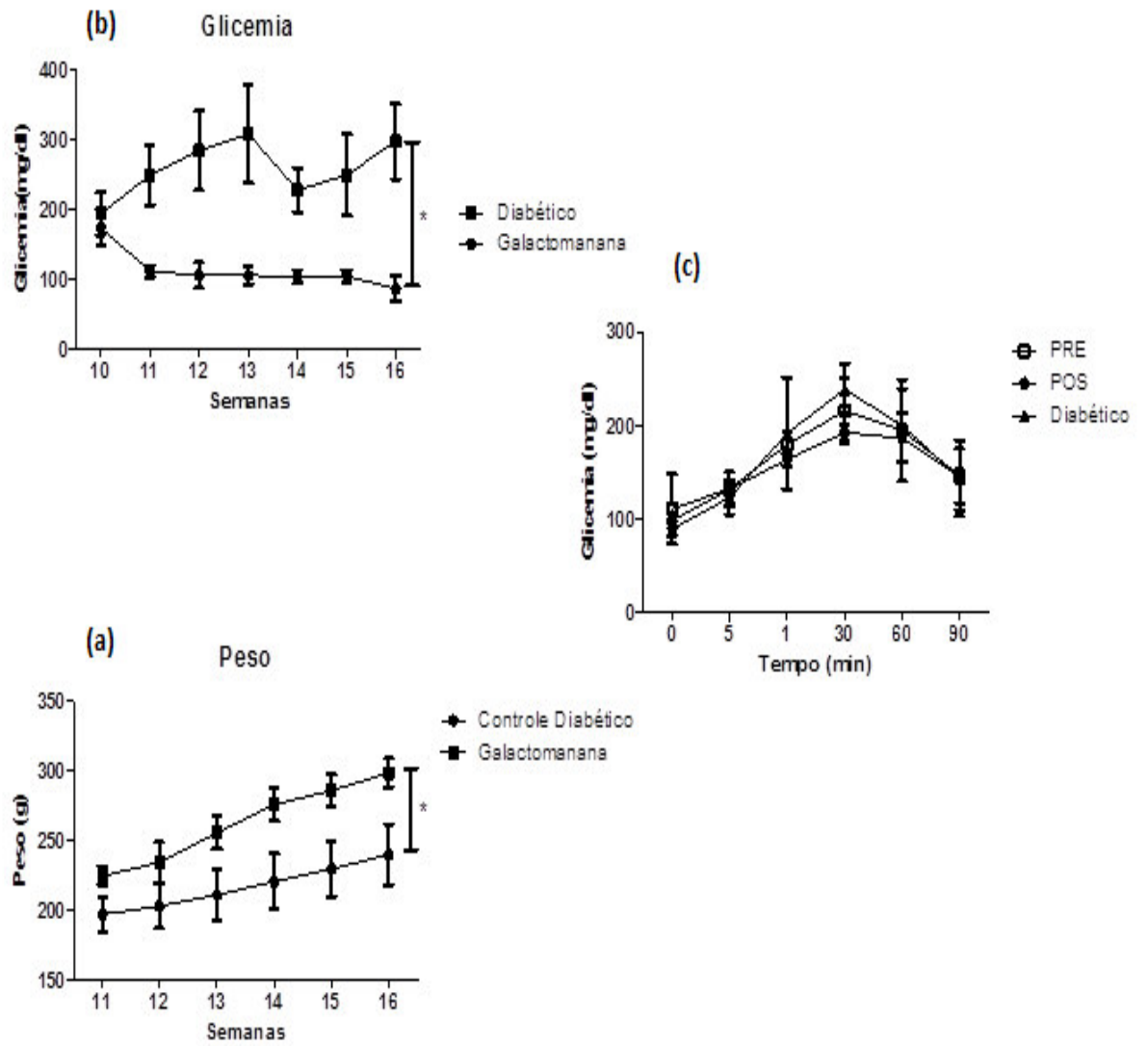


Figura 28. Triacilglicerol (TAG) and colesterol total (Colesterol) de ratos diabéticos tratados ou não tratados com galactomanana. * $p < 0,05$, diabetes vs. galactomanana. : C (controle); D (ratos diabéticos) e G (ratos tratados com galactomanana)

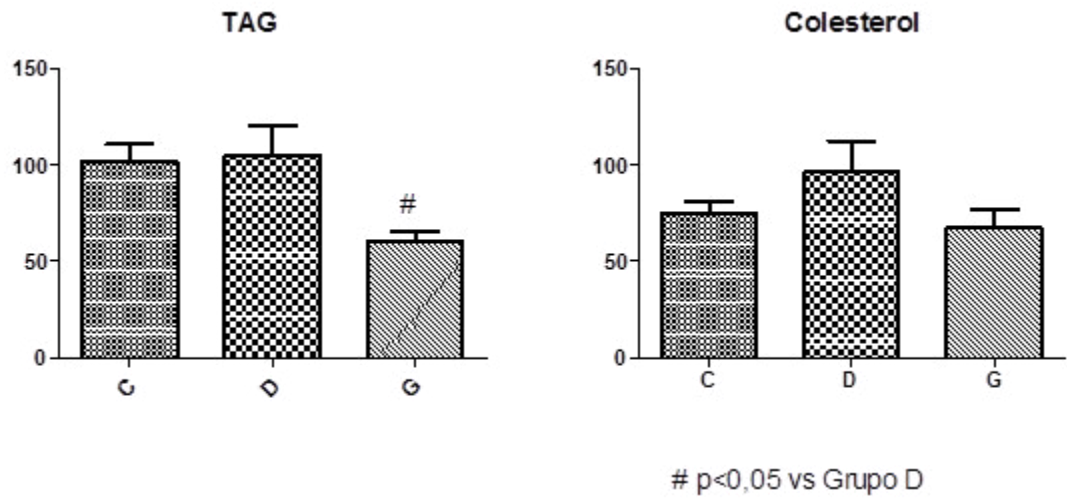
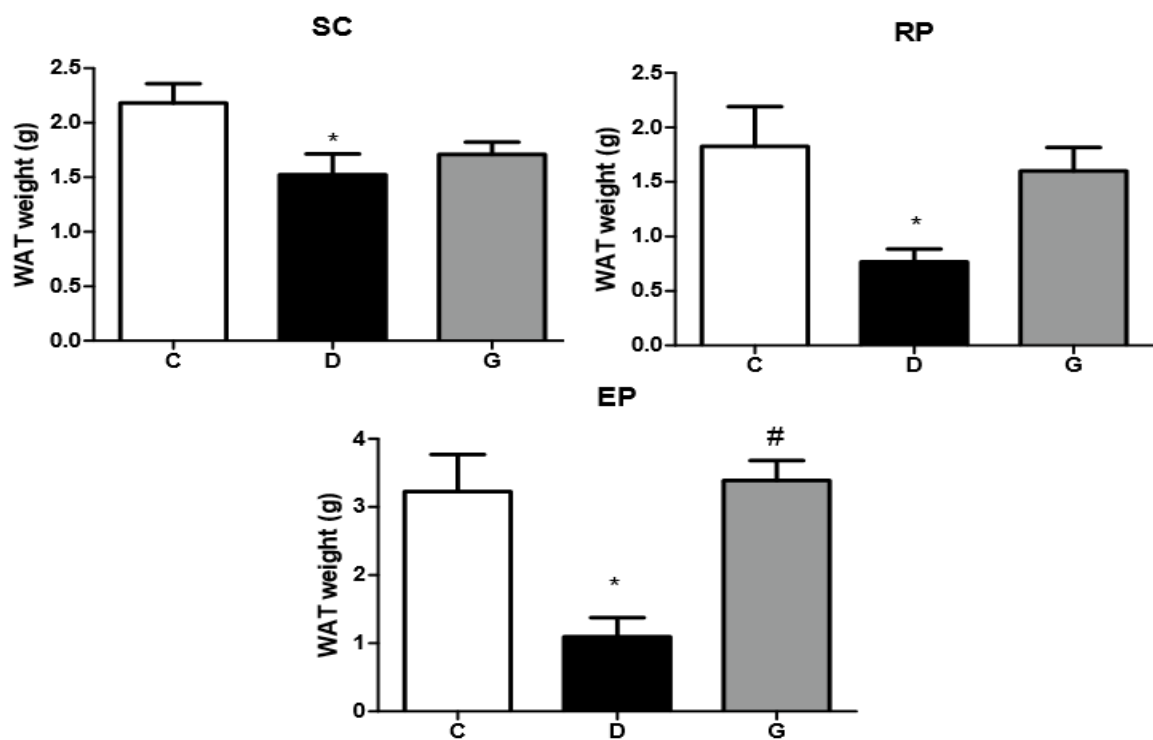


Figura 29. Massa corporea de ratos diabéticos tratados ou não tratados com galactomanana: C (controle); D (ratos diabéticos) e G (ratos tratados com galactomanana)



4.15.4.3 Resultados dos testes sobre a atividade cicatrizante da galactomanana purificada de *Caesalpinia ferrea* (JSGp)

4.15.4.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória e da citotoxicidade da galactomana

Na Figura 30 pode ser observado que a adição do PMA à suspensão de neutrófilos humanos induziu a ativação de neutrófilo humano expressa pelo aumento significativo da atividade de MPO ($80,6 \pm 2,6$ U/L) liberada por neutrófilos em relação ao grupo não tratado – HBSS ($42,2 \pm 1,7$ U/L). Porém, o pré-tratamento com galactomana (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu significativamente a atividade da MPO ($66,4 \pm 4,6$; $61,4 \pm 3,5$ e $62,4 \pm 2,5$ U/L) em relação ao grupo controle ($80,6 \pm 2,5$ U/L), com inibições da ordem de 17,5, 23,7 e 22,5 %, respectivamente. Resultado semelhante foi observado para a indometacina/anti-inflamatório padrão (inibidor inespecífico da ciclooxigenase) que reduziu em 47,5 % a atividade da MPO.

Na avaliação da possível citotoxicidade da galactomanana em neutrófilo humano, foi observado que a galactomanana (10 - 100 $\mu\text{g/mL}$) não aumentou significativamente a atividade da LDH. Por outro lado, o Triton X-100 aumentou significativamente a atividade da LDH ($99,4 \pm 4,4$ U/L) em relação ao grupo controle ($10,0 \pm 1,2$ U/L). Esses resultados comprovam que a atividade anti-inflamatória da galactomana determinada não está relacionada a uma ação citotóxica na membrana plasmática de neutrófilo humana

Figura 30. Avaliação da toxicidade da Galactomanana em neutrófilos humano através da mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com Galactomanana (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) e após os tempos de 15 minutos foi determinada a atividade da enzima LDH. Controle: Água - veículo; Tx: Triton X-100 (0,02% v/v) – padrão citotóxico. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

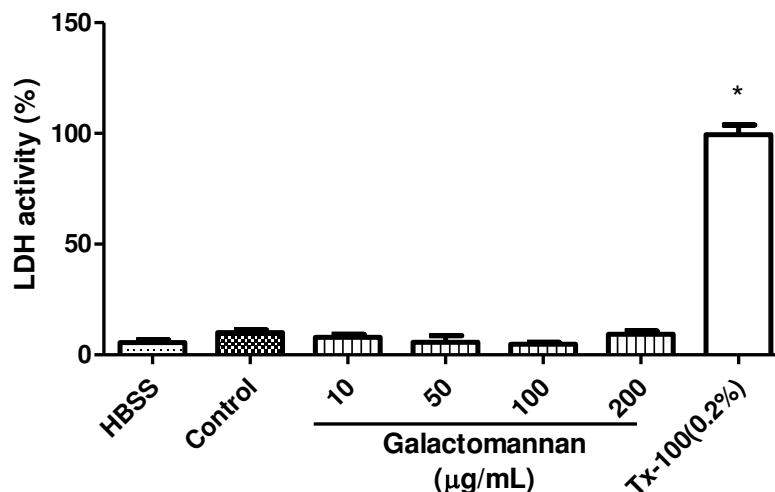
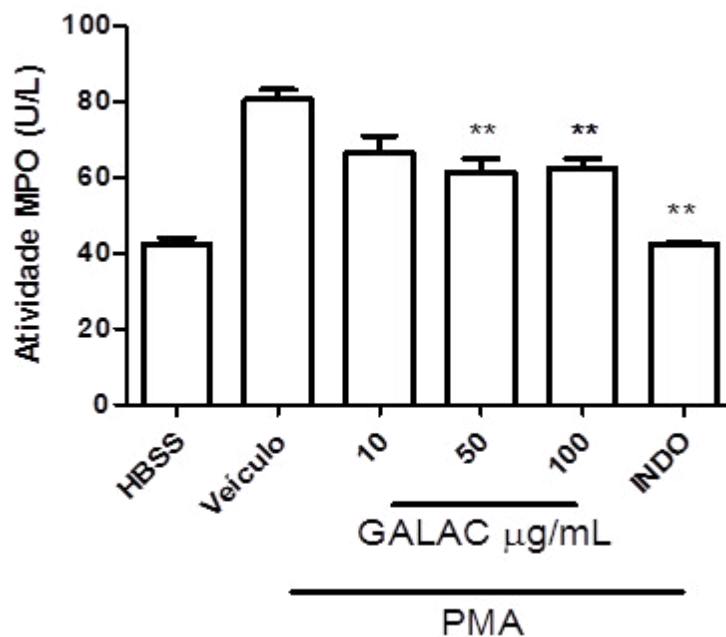


Figura 31. Efeito da Galactomanana sobre a desgranulação de neutrófilos induzidos por PMA. Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com galactomanana (GALAC, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente incubados com PMA (0,1 $\mu\text{m/mL}$). INDO: Indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de GALAC foram comparados ao grupo controle (100% de liberação de MPO). Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Veículo ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).



4.15.4.4 Resultados dos testes de aplicação do hidrogel de JSGp para a cicatrização em feridas abertas em ratos Wistar.

As lesões experimentais em ratos wistar foram avaliadas do ponto de vista macroscópico ao longo de 20 dias de experimento. O edema e a hiperemia, consequentes a inflamação e ao acúmulo de líquido intersticial e proteínas plasmáticas, no espaço extravascular, em resposta à ação cirúrgica, foram observados com uma frequência menor nas lesões tratadas com os hidrogéis. No término do 20º dia, no grupo no qual foi aplicado o hidrogel de JSGp obteve-se um percentual de área cicatrizada de 99,97%, resultado similar foi observado na aplicação da droga controle (Trofodermim), normalmente usada em lesões dérmicas, cuja a área de cicatrização foi de 99,40%. Esses dados demonstram que a galactomanana se apresenta como um promissor substituto em formulações e drogas para regeneração da pele. Para esse modelo de cicatrização, a galactomanana foi capaz de dinamizar o processo inflamatório, reduzindo o tempo de regeneração tecidual e promovendo o efeito da cicatrização das feridas (Figura 32 e 33).

Figura 32. Processo de cicatrização em feridas abertas em ratos Wistar com o uso dos géis a 1% de JSGs

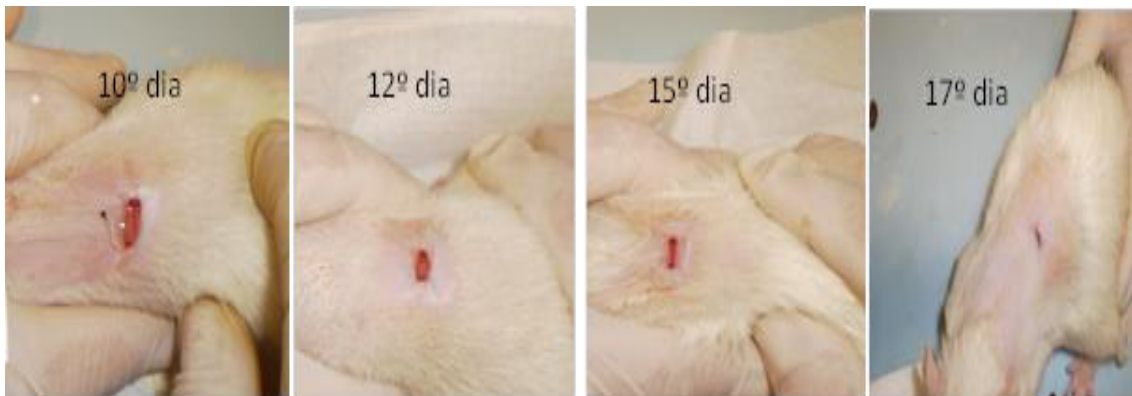
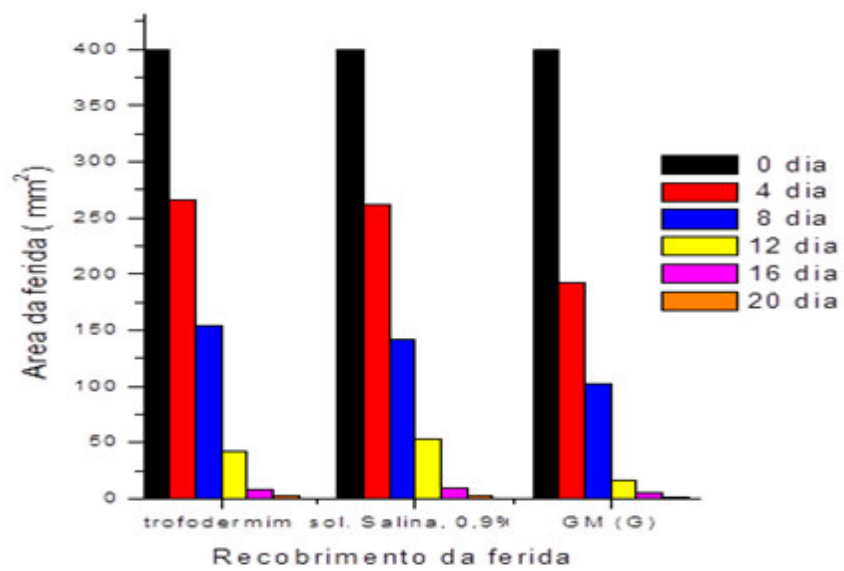


Figura 33. Gráfico de cicatrização em feridas abertas em ratos Wistar



5. CONCLUSÃO

Pelas condições submetidas, o rendimento após a extração e purificação foi de $31 \pm 1\%$ de galactomanana retirada dos endospermas das sementes de *Caesalpinia férrea*. Baseado nesses valores, o método empregado, foi adequado para extração de galactomanana das sementes de jucá (JSGp) que apresentou baixos teores de proteína, açúcares e nitrogênio e resíduos de impureza;

As condições de sulfatação estabelecidas nesse trabalho e comprovadas pelas análises de FTIR e Análise Elementar, indicaram a entrada de grupo sulfato na posição C-6 dos grupos de galactopirranose da JSGs extraída de *Caesalpinia ferrea*, portanto as condições de sulfatação foram adequadas para bem sucedida modificação do polímero. As pesquisas indicam que a bioatividade aumenta com o grau de sulfatação. A JSGs apresentou um valor alto de sulfatação de 1,19.

Os resultados indicaram que a JSGs interferem em várias fases da replicação do ciclo de HSV1, principalmente na etapa de adsorção do vírus, assim como, o efeito sobre o partículas de vírus e a expressão de proteínas virais. O efeito inibidor do composto na replicação de PV1 era mais forte e interferiram nas etapas iniciais de replicação do vírus, como por exemplo, na etapa de adsorção viral e de penetração, e na síntese de poliproteína viral. Os resultados sugerem que JSGs é um composto promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais.

O tratamento com galactomanana foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05$) a glicemia dos ratos diabéticos após o início do tratamento em relação aos animais diabéticos não tratados. No entanto, o tratamento com galactomanana não melhorou a tolerância à glicose em animais diabéticos como observado na curva glicêmica durante GTT. O peso do coxim de gordura EP de animais diabéticos tratados com galactomanana foi significativamente mais elevado do que de ratos diabéticos não tratados. O tratamento com galactomanana também foi capaz de reduzir significativamente os triglicéridos de animais diabéticos sem ocasionar perda de peso nos animais.

A avaliação da galactomanana JSGp para a aplicação em vias peritoniais e oral, apresentou $DL_{50} > 800 \text{ mg. Kg}^{-1}$ peso corpóreo. Esse valor indicou que a JSGp não se mostra muito tóxica para mamíferos (valores de $DL_{50} < 25 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Na avaliação da possível citotoxicidade da galactomanana em neutrófilo humano, foi observado que a galactomanana

(10 - 100 µg/mL) não aumentou significativamente a atividade da LDH. Esses resultados comprovam que a atividade anti-inflamatória da galactomanana não está relacionada a uma ação citotóxica na membrana plasmática de neutrófilo humano. Adicionalmente, os ensaios de citotoxicidade da JSGs em células hepáticas, tipo 2, ensaio de MTT, apresentou baixa toxicidade com um valor de concentração citotóxica de 3000mg/ml, que indicou baixa toxicidade do composto. Portanto, a JSGp e JSGs são de baixíssima toxicidade, podendo ser administrada com segurança.

As lesões experimentais em ratos wistar foram avaliadas do ponto de vista macroscópico ao longo de 20 dias de experimento. Os animais não apresentaram reações alérgicas ou retardo no processo inflamatório. Foi constatada uma involução da área da ferida mais rápido que a droga controle. A JSGp foi capaz de reduzir, em 20 dias de experimento, 99,97% da lesão, resultado similar a droga controle que foi de 99,40%. A JSGp apresentou uma excelente atividade cicatrizante em lesões dérmicas.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Hameed, U.K; El-Magly, U.I; Ishak, I.F; Tantawy, M.E. A contribution to the specification of Caesalpinioideae (L) based on morphological and molecular criteria. Beni-suef University journal of basic and applied sciences, v. 2, p 120-127, 2013.
- Adhyapak S, Dighe V. Antidiabetic activity of *Caesalpinia bon-ducella*-Linn. And *Coccinia indica* Wight & Arn. in alloxan induced diabetic rats. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical sciences, v4 (4): p1287-90. 2013
- Aimin,J; Yufa, Y; Ou, C; Bingjun, W; Liang, S; Xiaodong, L; Feng, X. Isolation and characterization of sulfated polysaccharide from the *Sargassum Pallidum* (Turn.) C.Ag. and its sedative/hypnotic activity. Journal of Medicinal Plants Research, v.. 5(21), p. 5240-5246, 2011
- Albuquerque, P.B.S; Barros, W. J; Santos, G.R.C; correia, M.T.S; Mourão, P.A.S; Teixeira, J.A; Cunha, M.G.C. cahractionization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. Carbohydrate Polymers, v. 104, p. 127-134, 2014.
- Alves, T. M. D; Silva, A.F; Brandão, M; Grandi, T. S. M; Smâmia, E. F.A; Smâmia, A; Zani, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 95, p.367-373, 2000.
- Alsarra, I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. International Journal of Biological Macromolecules, v.45, p. 16-21, 2009.
- Araújo, T. A. S; Alencara, N. L; Amorim, E. L. C; Albuquerque, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids. Journal of Ethnopharmacology, v. 120, p. 72-80, 2008.
- Andrade, C.T.; Azero, E.G.; Luciano, L.; Gonçalves, M.P. Rheological properties of mixtures of k-carrageenan from *Hypnea musciformis* and galactomannan from *Cassia javanica*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 27, p. 349 – 353, 2000.
- Badami, S.; Moorkoth, S.; Rai, S. R.; Kannan, E.; Bhojraj, S. Antioxidant Activity of *Caesalpinia sappan* Heartwood. Biol. Bull. Pharm, v. 26, nº11, p. 1534—1537, 2003.
- Balbach, F. As plantas que curam. 2ª Ed. Itaquaquecetuba, São Paulo: editora Missionária, 1997.
- Braga, R. Plantas do Nordeste, Especialmente de Ceará, 2ª Ed., três press. São Paulo, p. 45-46, 1976.
- Barros, F.C.N; Da Silva, D.C; Sombra, V.G; Maciel, J.S; Feitosa, J.P.A; Freitas, A.L.P; Paula, R.C.M. Structura characterixation of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 598-603, 2013.
- Batubara, I; Mitsunaga, T.; Ohashi, H. Brazilian from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. The Japan Wood Research Society, v.56, p. 77-81, 2009.

Bergmeyer, H.U; Bernt, E. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press;.p. 574-579, 1963.

Bourbon, A.I; Pinheiro, A.C; Ribeiro, C; Miranda,C; Maia, J.M; Teixeira,J.A.
Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*,v23,p 184-192, 2010

Buriti, F. C. A; Santos, K. M.O.; Sombra, V. G.; Maciel, J. S.; Sá, D. M.A. T.; Sales, H. O.; Oliveira, G. O.; de Paula, R. C.M.; Feitosa, J. P.A.; Moreira, A. C.O. M.; Moreira, R. A.; Egito, A. S. Characterisation of partially hydrolysed galactoman nan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fi bre. *Food Hyd rocolloids*. p 512-521. 2013.

Bragança, L.A.R. *Plantas Medicinai s Antidiabéticas*. EDUFF press, Niterói, RJ, p. 172, 2006.
Braga, R. *Plantas do Nordeste, Especialmente de Ceará*, 2ª Ed., três press. São Paulo, p. 45-46, 1976.

Berezovskaya, I. V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration.*Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 37, p. 32-34, 2003.

Biesert,L; Adamski, M; Zimmer, G; Suhartono, H; Fuchs, J; Unkelbach, U;Mehlhorn, R; Hideg, K; Milbradt, R; Rubsamen-Waigmann, H. Anti-human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 179 ,p.307–321, 1990.

Brownlee, I.A., . The physiological roles os dietary fibre.*Food Hydrocolloids*, 25, 238-255. 2011.

Buckeridge, M. S; Panegassi, V. R; Rocha, D.c; Dietrich, S. M. C.Seed galactomannan in the classification and evolution of the leguminosae.*Phytochemistry*, v38 (4), p871-875. 1994)

Cardoso, S.; Coimbra, M. A.; da Silva, J. A .L. Calcium-mediated gelation of an olive pomacepectic extract.*Carbohydrate Polymers*, v52: p. 469-475, 2003.

Cardozo, F.T.G.S; Camellini, C.M; Mascarello,A; Rossi, M.J; Nunes, R.J;
Barardi, C.R.M; Mendonc, M.M; Simões, C.M.O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Research*, v. 92, p 108–114, 2011.

Carvalho, A. F. F. U.; Melo, V. M. M.; Aguiar, L. M. B. A.; Matos, F. J. A. Avaliação da Toxicidade de Extratos de Plantas Medicinai s Através de Bioensaio com*Artemia salina* Leach. *Ciência e Cultura*. v. 40(11). p. 1109-1111. 1987.

Carvalho, J. C. T; Teixeira, J. R. M; Souza, P. J. C; Bastos, J. K; Filho, D. S; Sarti, S. J. Preliminary studies of analgesic and antiinflamatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Jounal of Ethnopharmacology*. v. 53, p. 175 -178, 1996.

Carvalho A. L. N. *et al.* Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice, *J. Ethnopharmacol.*v.135, p. 730 –736, 2011.

Cerqueira, M.A; Pinheiro, A.C; Souza, B.W.S; Lima, A.M.P; Ribeiro, C; Miranda, C; Teixeira, J.A; Moreira, R.A; Coimbra, M.A; Gonçalves. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers* , v75, v408-414, 2009.

Chang, Z.; Yumin, D.; Yan, L.; Jianhong, Y.; Tao, F.; Le, Z.; John, F. K. Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers* v.73, p. 322–331, 2008.

Chakraborty, G. S. Antioxidant activity of the successive extracts of *caesalpinia pulcherrima* flowers. *Pharmacologyonline*, v.1, p. 362-365, 2009.

Cheng, H.Y; Lin,T.C;Yang, C.M; Wang, K.C; Lin, L.T; Lin,C.C. Putranjivain, a from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 3, p.577–583, 2004.

Correia, P. C; Branco, P.D; Amary, A. Queimaduras: fisiopatologia, diagnóstico, Avaliação e seu tratamento clínico e cirúrgico. 2ªed, Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, p. 135, 1980.

Dealey, C. Cuidado de feridas: Um guia para as enfermeiras. 3ªed, São Paulo: Atheneu Editora, p. 200 – 201, 2008.

Dea, L.C; Morrison, A. *Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v31, pp 242-312, 1975.

Dakia, P. A., Wathelet, B., & Paquot, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry* , 102 , 1368–1374. 2007

Dealey, C. Cuidado de feridas: Um guia para as enfermeiras. 3ªed, São Paulo: Atheneu Editora, p. 200 – 201, 2008.

Dong, J., Cai, F., Shen, R., Liu, y. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chemistry*, v129, p1066-1071. 2011.

Ekblad, M; Adamiak, B; Bergstrom, T; Johnstone, K.D; Karoli,T; Liu, L; Ferro,V; Trybala, E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus *Antiviral Research*, v. 86, p. 196–203, 2010.

Ezuruike, U.F., Prieto, J.M.. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *Journal of Ethnopharmacology*. v155, p857-924. 2014.

Faccin, L.C; Benati, F; Rincão, V.P; Mantovani, M.S; Soares, S.A; Gonzaga,M.L.;Nozawa,C; Linhares, R.E.C.. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1 Letters in Applied Microbiology, v. 45, p. 24–28, 2007.

Faccin-Galhardi, L. C.; Yamamoto, K. A.; Ray, S.; Ray, B.; Carvalho Linhares, R. E.; Nozawa, C. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *Journal of Ethnopharmacology*, v142 (1), p. 86-90, 2012.

Fiszman, S., Varela, P. The role of gums in satiety/ satiation. A review. *Food Hydrocolloides*, v32, p147-154, .2013.

Feugeas,J; Mory, S; Jeulin,H; Velay,A; Pertek, J-P. ; Ladriere , M. ; Losser, M-R. . Herpes simplex virus type 1 hepatitis due to primary infection in a pancreas-kidney transplant recipient *Journal of Clinical Virology*, v.80 , p.57–59, 2016.

Ganter, J.L.M.S., Heyraud, A., Petkowicz, C.L.O., Rnaudo, M., Fany, R. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. *International Journal Biological Macromolecules*,v 17(1),p1 1995.

García, R. V.; Martínez,R. M.; Rodríguez, V. R.; Guerra,R. R.; Pacheco,I. T.; Chavira, M. M. G. C.; López, J. L. A.; Lorenzo Guevara-Olvera, L.G.; Pérez, A. A. F.;Piña, G.L.;

Garti, N., Slavin, Y., Asern, A. Surface and emulsification properties of a new gum extracted from *Portulacaoleracea* L. *Food Hydrocolloids*, v13, p145-155,.1999.

Gidley, M.J. Hydrocolloids in the digestive tract and related health implications. *Current Opinion in colloid & interface Science*. v18, p371-378. 2013.

Gong, P., Peng, S., He, J., Deng, M., Jiang, B., Wang, K..One-step synthesis of glucose-branched galactomannan. *Carbohydrate Research*, v346, p1973-1977. 2011.

Gong, Y; Raj, K.M; Luscombe, C.A; Gadawski, I;Tam, T; Chu,J; Gibson, D; Carlson, R; Sacks, S. L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, v. 64, p. 127–130, 2004.

Gavanji,S; Sayedipour ,S.S; Larki , B; Bakhtari,A. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. *Journal of Acute Medicine*, v. 5 p.62-68, 2015.

Gonzalez, M; Alarcon, B; Carrasco, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 31, p. 1388–1393, 1987.

Hodge, H.C.; Sterner, J. H. Tabulation of toxicity classes. *An Ind Hyg Assoc Quart*, v. 10, p. 93–98, 1949.

Huang, X; Kakuda, Y; Cui, W. Hydrocolloids in emulsions; particle size distribution and interfacial activity, *Food Hydrocolloids*, v15, p 533-542, 2001.

Huber, R; Bross, F; Schempp, C; Gründemann. Arnica and stinging nettle for treating burns- A self-experiment. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 19, p. 272-280, 2011.

- Kabeya LM, Kanashiro A, Azzolini AECS, Soriani FM, Lopes JLC et al. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*.v111, :p103–14, 2002;.
- Kiho, T, Itahashi, S, Matsunaga, M, Usui, T, Ukai, S, Mori, H, Sakamoto, H, Ishiguri, Y. Anti-diabetic activity and structural feature of a galactomannan elaborated by *Pestalotiopsis* species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, .v20, p118-121.1997.
- Kim, H; Wang, Q; Shoemaker, C.F; Zhong, F; Bartley, G.E; Yokoyama, W.H. Polysaccharide gel coating of the leaves of *Brasenia shreberi* lowers plasma cholesterol in hamsters. *Journal of traditional and complementary medicine*, v5, p56-61, 2015.
- Klyosov, A.A; Dotsenko, G.S; Hinz, S.W.A; Sinitsyn, A.P. Structural features of β -(1-4)D-galactomannans of plant origin as a probe for β -(1-4)-mannanase polymeric substrate specificity. *Carbohydrate Research*, v.352, p. 65-69, 2012.
- Kiho, T, Itahashi, S, Matsunaga, M, Usui, T, Ukai, S, Mori, H, Sakamoto, H, Ishiguri, Y. Anti-diabetic activity and structural feature of a galactomannan elaborated by *Pestalotiopsis* species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, .v20, p118-121.1997
- Lucisano, Y. M.; Mantovani, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. *The Journal of Immunology*, v. 132, p2015-2020, 1984.
- Li, J.M., Nie, S.P. (2015). The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*, xxx, p 1-6.
- Lindstrom, C; Holst, O; Hellstrand, P; Oste, R; Andersson, K.E. Evaluation of commercial microbial hydrocolloids concerning their effects on plasma lipids and caecal formation of SCFA in mice, *Food Hydrocolloids* v28, p367-372, 2012.
- Lubambo, A.F; Freitas, R.A; Sierakowski, M.R; Lucyszyn, N; Sasaki, G.L; Bruno, M.S; Saul, C.K. Electrospinning of commercial guar-gum; Effects of purification and filtration. *Carbohydrate polymers*, v 93, p 484-491, 2013.
- Maas, N.C.; Gracher, A.H.P; Sasaki, G.L.; Gorin, P.A.J; Lacomini, M; Cipriani, T.R. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. *Carbohydrate polymers*, v89, , p1081-1087, 2012.
- Masalova, O; Kulikouskaya, V; Shutava, T; Agabekov, V. Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment. *Physics Procedia*, v. 40, .p 69-75, 2013.
- Melo, F.L; Benati, F.J; RomanJunior, W.A; Mello, J.C.P; Nozawa, C; Linhares, R.E.C. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research*, v163, .p136–139, 2008
- Menezes, I. A. C; Moreira, I. J. A; Carvalho, A. A; Antonioli, A. R; Márcio R.V. Santos, M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vascular Pharmacology*, v.47, p. 41–4, 2007.

- Meyer, B.N; Ferrigni, N.R; Putnam, J.E; Jacobsen L.B; Nichols, D.E; Mclaughlin, J.L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med*, v.45, p. 31-34, 1982.
- Minari, M.C,Rincão, V.P; Soares, S.A; Ricardo, N.M.P.S; Nozawa, C. Linhares, R.E.C. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1 *Acta Virologica*, v. 55, p. 219–223, 2011.
- Mudgil, I.D., Bark S.. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review, *International Journal of Biological*, v 61,p 1-6. 2013
- Momeni, M; Hafezi, F; Rahbar, H; Karimi, H. Effects of silicone gel on burn scars.*Burns*, v. 35, p. 70-74, 2009.
- Moreira, r.; chenlo, f.; silva, c.; torres, m.d.; díaz-varela, d.; hilliou, l.; argence, h. surface tension and refractive index of guar and tragacanth gums aqueous dispersions at different polymer concentrations, polymer ratios and temperatures. *food hydrocolloids*, v. 28, p. 284-290, 2012.
- Nakamura, E. S; Kurosaki, F; Arisawa, M; Mukainaka,T; Takayasu, J; Okuda, M; Tokuda, H; Nishino, H; Pastore, F. Jr. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis.*Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 135-137, 2002.
- Nakamura, E.S; Kurosakia, F; Arisawa, M; Mukainaka, T; Okuda, M; Tokuda, H; Nishino,H; Pastore Jr, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v. 177, p. 119–124, 2002.
- Nirmal, N.P; & Panichayupakaranant, Anti-Propionibacterium acnes assay-guided purification of brazilin and preparation of brazilian rich extract from *Caesalpinia sappan* heartwood . *Pharmaceutical Biology* p1204-1207 y52, Issue 9, 2014
- Nishimura, T; Toku, H; Fukuyasu, H. Antiviral Compounds.XII. Antiviral activity of aminohydrazone of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds aguenst influenza virus in eggs and mice. *The Kitasato. Archives of Experimental Medicine*, v. 50, p.39–46, 1977.
- Nkafamiya, I.I; Barminas, J.T;Aliyu B. A; Osemeahon, S.A.Encapsulation of indomethacin in calcium alginate-galactomannan hydrogels..*International Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, v. 1(2), p.29-34, 2011.
- Oliveira ,A. C, Andreotti,S, Andreotti, Farias, T.S.M, Leal, F.L, TLeal, Proença A.R.G, Campaña, A.B Campaña, Souza, A.H, Sertié R.A.L, Carpinelli, A.R, Neto, J.C, Lima, F.B.. Metabolic Disorders and Adipose Tissue Insulin Responsiveness in Neonatally STZ-Induced Diabetic Rats Are Improved by Long-Term Melatonin Treatment. *Endocrinology*,v 153, n.3, .p2178- 2188.2012.

Oliveira, N. M., Dourado, F. Q., Peres, A. M., Silva, M. V., Maia, J. M., & Teixeira, J. A. Effect of guar gum on the physicochemical, thermal, rheological and textural properties of green Edam cheese. *Food and Bioprocess Technology*, v4 p1414- 1421, 2011.

O'Neill, A. N. *Canadian Journal of Chemistry*, v.33, p.1097–1101, 1995.

Ono, L; Wollinger, W; Rocco, I.M; Coimbra, T.L.M; Gorin, P.A.J; Sierakowski, M-R. In vitro antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever vírus (BeH111strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research*, v. 60, p. 201-208, 2003.

Pawar, H. A, .Lalitha, K. G. solation, purification and characterization of galactomannans as an excipient from *Senna tora* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* v65, p167–175. . 2014.

Prajapati, V.D; Jani, G.K; Moradiya, N.G; Randeria, N.P; Nagar, B.J;Naikwadi, N.N;Variya, B.C. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 60, p. 83-92, 2013.

Peters, V. M; Souza, S. O; Carvalho, J. C. T; Borges, L. V; Guerra, M. O. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 7 (5), p. 268 - 272 BLACPMA ISSN 0717 7917, 2008.

Peyman, S;Yousef ,D;Fatemeh, M.T;Fatemeh, S; Reza, R.Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. *Carbohydrate Polymers*; v.83; p 1570–1574; 2011.

Pires, P.A.J.L.; Gorin, F.; Feicher,F.; Sierakowski, M.R. An active heparinoid obtained by sulphation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. *Carbohydrate polymers*, v.46, p.165-169,2001.

Pliaka, V; Dedepsidis, E; Kyriakopoulou, Z; Mpirli, K; Tsakogiannis, D; Pratti, A.;LevidiotouStefanou,S; Markoulatos, P. A new RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains.*Molecular and Cellular Probes*, v. 24, p. 115–123, 2010.

Rates, S. M. K. Plants as source of drugs.*Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

Rotbart, H.A. Treatment of picornavirus infections. *Antiviral Research*, v. 53, p. 83–98, 2002.

Rincão, V.P; Yamamoto, K.A; Ricardo,N.M.P.S; Soares, S.A; Meirelles,L.D; Nozawa, C; Linhares, R.E.C. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: Structural features and antiviral activity. *Virology Journal*, v. 9, p. 1–6, 2012

Santander, S. P.; Aoki, M.; Hernandez; J. F.; Pombo, M; Moins-Teisserenc, H.; Mooney, N.; Fiorentino, S. Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells *International Immunopharmacology*, v. 11, PP.652-660, 2011.

Sampaio, F. C; Pereira, M. S. V. P; Dias, C. S;Costa, V. C. O;Conde, N. C. O; Buzalaf, M. A. R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, p. 289–294, 2009.

Savu O, Ionescu-Tirgoviste C, Atanasiu V, Gaman L, Papacocea R, Stoian I. Increase in total antioxidant capacity of plasma despite high levels of oxidative stress in uncomplicated type 2 diabetes mellitus *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*; v40 (2): p709-16, 2012

Singh,U.; Kunwar, A.; Srinivasan, R.; Nanjan,M.J.; Priyadarsini, I.K. Differential free radical scavenging activity and radioprotectionof *Caesalpinia Digyna* extracts and its active constituent. *Journal of Radiation Research.*, v.50, p.425–433, 2009.

Singh, V.; Srivastava, A. Tiwari, A. *International Journal of Biological Macromolecules*.V.45, p.293–297, 2009.

Sierakowski, M.R.; Milas, M.; Desbrie`res, J.; Rinaudo, M. Specific modifications of galactomannans.*Carbohydrate Polymers*, v. 42, p.51–57, 2000.

Souza, A.B., Souza, L.M.S., Carvalho, J.C.T., Maistro, E.L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrowcells of Wistar rats. *Genetics and Molecular Biology* ,v. 29, p 380–383, 2006.

Slaughter,S.L., Ellis, P.R., Jackson, E.C., Butterworth, P.J. (2002). The effect of guar galactomannan and water availability during hydrothermal processing on the hydrolysis of starch catalysed by pancreatic α -amylase.*BiochimicaetBiophysica Acta*. v1571,p 55-63. 2002

Souza, B.W.S; Cerqueira, M.A; Bourbon, A.I; Pinheiro, A.C; Martins, J. T; Teixeira, J.A; Coimbra, M.A; Vincente, A.A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 287-292, 2012.

Souza, C.F; Lucyszyn, N; Ferraz, F.A; Sierakowski, M.R. *Caesalpinia ferrea* var. *férrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan.*Carbohydrate Polymers*, v. 82, p 641-647, 2010.

Srichamroen A, Field C.J, Thomson A.B, BasuT.K..In vitro intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (*Trigonellafoenumgraecum* L) in genetically lean and obese rats. *Nutrition Research*, v29, p49–54. 2009.

Srivastava, M., &Kapoor, V. P.Seed galactomannans: An overview. In *Chemistry & Biodiversity*, 2, 295–317, 2005

Steffe, J.F.. *Rheological methods in food process engineering*. Freeman Press. 2. ed. Michigan, 418. 1996.

Takada, J., Machado, M.A., Peres, S.B., Brito, L.C., Borges, S,C.N., Costa, C.E.M., Alaniz, M.H. F, Andreotti, S.; Lima, F.B. .Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism Clinical and Experimental*, v.56, p.977-984.2007.

Takada, J., Alaniz, M.H.F., Campos, T.B.F., Andreotti, S., Campana, A.B., Okamoto, M., Silva, C.N.B., Machado, U.F., Lima, F.B. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. *Journal of Endocrinology*, v198, .p51–60.2008.

Tal-Singer, R.; Lasner, T.M.; Podrzucki, W.; Skokotas, A.; Leary, J.J.; Berger, S.L.; Fraser, N.W. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures *Journal of Virology*, v. 71, p.5268–5276, 1997.

Tester, R.F. e Al-Ghazzewi, F.H. Mannanas and health, with a special focus on glucomannans. *Food Research International*, v. 50, p. 384-3391, 2013.

Torres, M.D.; Hallmark, B.; Wilson, D.I. Effect of concentration on shear and extensional rheology of guar gum solutions. *Food Hydrocolloids*, v.40, p. 85-95, 2014.

Ueda, H.; Tachibana, Y.; Moriyasu, M.; Kawanishi, K.; Alves, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomedicine*, © Urban & Fischer Verlag, v. 8(5), p. 377–381, 2001.

Vasconcelos, I. M. et al. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). *Arch Biochem Biophys*, v. 312, p. 357–366, 1994.

Viebke, C., Assaf, S.A., Phillips, G. Food hydrocolloids and health claims. *Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre*, v4, p101-114. 2014

Xu, X., Xu, P., Ma, C., Tang, J. Zang,. Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, v 31, p318-337.2014

Yang, L. & Zang, L.M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, v76, p349-361, 2019

Yun, J.W. Possible antiobesity therapeutics from nature. A review. *Phytochemistry*, v71, p1025-1611, 2010.

Xiaofang, W.; Junlong, W.; Ji, Z.; Baotang, Z.; Jian, Y.; Yunpu, W. Structure–antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 46, p. 59–66, 2010.

Xie, J.H.; Liu, X.; Shen, M.Y.; Nie, S.P.; Zhang, H.; Li, C.; Gong, M.; Xie, M.Y. purification, physicochemical, characterization and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves. *Food chemistry*, v 136, p 1453-1460, 2013.

Xu, X., Xu, P., Ma, C., Tang, J. Zang,. Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, v 31, p318-337.2014

Zanin JL, de Carvalho BA, Martineli PS, dos Santos MH, Lago JH, Sartorelli P, et al. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*; v17 (7): p7887-902, 2012

Zhao, L;Wientjes, G. M; Au, J.S. Evaluation of Combination Chemotherapy-Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyse. *Clinical Cancer Research*, v. 10, pp.7994–8004, 2004.

Yao, H.T; Huang, S.Y; Chiang, M.T. A comparative study on hypoglycemic and low molecular Weight chitosan in streptozotacin-induced diabetic rats. *Food chemical toxicology*, v46. P 1525-1534, 2007.

Yamamoto, K.A.; Rincão, V.P; Linhares, R.E.C; Nozawa, C.; *Virus Review and Research* v. 14, p.106–107, 2009.

Yongzhen, T.; Lina, Z.; P Cheung, P.C.K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydrate Research*.v.341, p. 2261–2269, 2006.

Yu, C-Y; Yin, B-C; Zhang, W; Cheng, S-X; Zhang, X-Z; Zhuo, R-X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan , alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 68, p. 245-249, 2009.

Wanders, A.J; Feskens, E.J.M; Jonathan, M.C; Shols, H.A; Graaf, C. Mars, M.. Pectin is not pectin: A randomized trial on the effect of different physicochemical properties of dietary fiber on appetite and energy intake. *Physiology & Behavior*, v 128, p 212-219, 2014.

Wang, L., LI, X. & Vhen, Z.. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 44, p. 211–214, 2010.

Wang, J; Somasundaran, P. Study of galactomannose interaction with solids using AFM, IR and allied techniques. *Journal of Colloids and Interface science*. V309, p 375-383, 2007.

Wang, X; Wang, J; Zhang, J; Zhao, B; Yao, J; Wang, Y. Structure antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 59-66, 2010.

Wang, J.; Zhao, B.; Wang, X.; Zhang, J. Preparation and characterization of sulfated galactomannan from guar gum: Optimization of reaction conditions by BBD and molecule conformational studies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* v. 43, p.889-896, 2012.

Washiyama, M; Sasaki), Hosokawa, T; Nagumo, S. Anti-inflammatory Constituents of Sappan Lignum *Biological and Pharmaceutical Bulletin* v 32 No. 5 p 941-944 .2009