

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**Avaliação do tratamento tópico com a lectina de *Eugenia malaccensis*
frente à cicatrização cutânea em camundongos**

Fernanda Vidal de Souza Araújo

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

Recife, 2007

Fernanda Vidal de Souza Araújo

**Avaliação do tratamento tópico com a lectina de *Eugenia malaccensis*
frente à cicatrização cutânea em camundongos**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica
pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Araújo, Fernanda Vidal de Souza

Avaliação do tratamento tópico com a lectina de *Eugenia mallaccensis* frente à cicatrização cutânea em camundongos/ Fernanda Vidal de Souza. – Recife: O Autor, 2007.

52 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteínas 2. Lectinas – *Eugenia mallaccensis* 3. Feridas cutâneas 4. Cicatrização cutânea – Camundongos I. Título.

577.112 CDU (2.ed.)

UFPE

572.6 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-092

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Fernanda Vidal de Souza Araújo**, realizada em 26 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:15 minutos do dia 26 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins - Depto. de Bioquímica/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Fernanda Vidal de Souza Araújo**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, Chefe do Depto. de Bioquímica, na impossibilidade da presença da Coordenadora do Curso supra citado, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, da sua Co-Orientadora Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Maria Tereza dos Santos Correia, na qualidade de Presidente, Maria das Graças Carneiro da Cunha, ambos do Depto. de Bioquímica, Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, Pesquisadora do CCB/UFPE, e Mário Ribeiro de Melo-Júnior, da ASCES -Associação Caruaruense de Ensino Superior. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Avaliação do tratamento tópico com a lectina de *Eugenia malaccensis* frente à cicatrização cutânea em camundongos"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, em seguida para o Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior, e finalmente para a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, os quais agradecerem o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 26 de fevereiro de 2007.

Tereza Correia
Maria das Graças Carneiro da Cunha
Adriana Argolo
Mário Ribeiro de Melo-Júnior

João Manoel

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	8
1. Cicatrização	8
2. Biomaterial	15
3. Lectinas	16
4. Lectina de <i>Eugenia malaccensis</i>	18
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVO	21
1. Objetivo Geral	21
1.2 Objetivos específicos	21
ARTIGO	22
CONCLUSÕES	44
PERSPECTIVAS FUTURAS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que conquistei até hoje.

Aos meus pais por tudo que eu sou. Vocês são muito importantes para mim.

A minha orientadora, Maria Tereza dos Santos Correia, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto e pela convivência tão prazerosa durante esses dois anos.

A minha co-orientadora, Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, por está sempre ao meu lado e me incentivar desde o meu comecinho no PIBIC da UFRPE.

A minha amiga e “professorinha” Vanessa Brustein (Nessinha), por me ensinar a arte de purificar a lectina de *Eugenia malaccensis*, sem a sua atenção comigo nada disso teria acontecido.

A Rosangela (Dandinha) pelo apoio da profissional bioquímica, mas principalmente como amiga-irmã.

Ao meu namorado Felipe, por sempre está ao meu lado e apoiar as minhas decisões. Amo você.

A todos aqueles que fazem o Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, especialmente a Adriana e Jaira, pela constante companhia e amizade.

A Flávio, amigo da Biotecnologia do LIKA, pela colaboração nesta dissertação e os momentos de trabalho e alegrias no LIKA no período da realização desse experimento.

Aos meus amigos da turma do mestrado de Bioquímica, Fabrício, Humberto, Juliene, Lucíola, Elaine e especialmente a Marcela (Mar), por ser a minha fiel amiga para todos os momentos, desde os tempos de Caxambu.

A Carmelita, do Setor de Patologia do LIKA, por sempre poder contar com o seu apoio técnico e todos os outros amigos da Patologia, especialmente Mário e Jorge, obrigada por me passarem tanta felicidade e energia positiva.

Ao suporte financeiro disponibilizado pelo CNPq durante esses dois anos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com esse meu trabalho e que não foram citados acima, o meu muito abrigada.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
Figura 1. Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: <i>Experts Reviews in Molecular Medicine</i> ©, 2003. Cambridge University Press.	10
Figura 2. Visão geral da planta <i>Eugenia malaccensis</i> : Frutos (a) e as sementes (b). Fonte: www.frucafe.com.br/.../jambo_vermelho_fruta2.jpg	20

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

FIGURA	Página
Figura 2. Percent of clinic signals, average of wound area (cm ²) and time in days after the treatment topic with lectin from <i>Eugenia malaccensis</i> (A) and NaCl 150 mM (B).	39
Figura 2. Percent of clinic signals and time in days after the treatment topic with lectin from <i>Eugenia malaccensis</i> (A) and NaCl 150 mM (B).	39
Figure 3. Macroscopic aspects of the experimental wound. Day of surgery: A, group EmaL and E, NaCl 150mM; Second day after surgery (AS): B, group EmaL and F, NaCl 150mM; Seven day AS: C, group EmaL and G, NaCl 150mM, Twelve days AS: D, group EmaL and H, NaCl 150mM.	39
Figure 4. Histopathological aspects of the cutaneous wounds, Trichomic of Masson (100X). 2 th day after surgery: A, NaCl 150 mM and B, EmaL; 7 th day after surgery: C, NaCl 150 mM and D, EmaL and 12 th day after surgery: E, NaCl 150 mM and F, EmaL. c- crust; i- infiltrated inflammatory; at- area of transition; a- angiogenesis; → fibroblast; * collagenous fibers; v- vascular granulation tissue; r- reepithelialization; fv- fibrovascular granulation tissue; ep- epidermis; f- fibrous granulation tissue.	39

RESUMO

A lectina EmaL foi extraída da *Eugenia malaccensis*, importante espécie da família Myrtaceae. Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento tópico com a EmaL no processo cicatricial cutâneo, foi produzida uma ferida na região dorsal (1 cm²) em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas (n= 15/grupo), tratados diariamente com EmaL 10 µg e NaCl 150 mM durante 12 dias. A avaliação clínica foi realizada diariamente, observando-se que as feridas tratadas com a EmaL apresentaram sinais inflamatórios como edema ($\chi^2 = 3,63$; $p < 0,05$) e hiperemia ($\chi^2 = 2,66$; $p < 0,05$) estatisticamente menos intensos quando comparadas ao controle. No 12º dia PO, as lesões tratadas com a lectina e o grupo controle apresentaram uma área média de $0,02 \pm 0,01$ cm² e $0,02 \pm 0,02$ cm², respectivamente. Biópsias para análise histopatológica e exames microbiológicos foram realizados após 2, 7 e 12 dias. A análise microbiológica das lesões evidenciou apenas o crescimento de *Staphylococcus* sp. Histopatologicamente, no 12º dia, as lesões tratadas com a EmaL apresentaram reepitelização (completa ou parcial), e áreas de transição mais bem evidenciadas do que as do grupo controle, especialmente devido ao arranjo bem organizado das fibras colágenas presentes no tecido de granulação fibroso. O presente estudo sugere uma evidência farmacológica preliminar sobre o uso da EmaL no processo de reparação de feridas cutâneas.

Palavras-chave: Lectinas; *Eugenia malaccensis*; feridas cutâneas; cicatrização.

ABSTRACT

The EmaL lectin was extracted from *Eugenia malaccensis*, important specie of the Myrtaceae family. Aiming at to evaluate the influence of the topical treatment with the EmaL in the cutaneous healing process, a wound was surgically produced in the dorsal region (1cm²) in female albino Swiss (*Mus musculus*) mice (n = 15/grupo) and daily treated with 10 µg of EmaL and 150 mM NaCl during 12 days. In the daily clinical evaluation it was found that the wounds treated with the EmaL presented inflammatory signals as edema ($\chi^2= 3.63$; p< 0.05) and hyperemia ($\chi^2= 2.66$; p< 0.05) statistically less intense when compared to the control. On the 12th post surgical day, the wounds treated with the lectin and the group control presented an average area of 0.02 ± 0.01 cm² and 0.02 ± 0.02 cm², respectively. Biopsies for histopathology analysis and microbiologic examinations were carried out on the 2nd, 7th and 12th days. The microbiological analysis of the wounds evidenced only the growth of *Staphylococcus* sp. From the histopathological point of view, on the 12th day, the injured tissue treated with EmaL presented reepithelization (complete or partial) and areas of transition more evidenced than those of the control group, especially due to well organized pattern of collagen fibres presented in the fibrous granulation tissue. The present study suggests a preliminary pharmacological evidence for the use of the EmaL in the repairing process of cutaneous wounds.

Keywords: Lectin, *Eugenia malaccensis*, cutaneous wound, wound healing.

INTRODUÇÃO

1. Processo cicatricial

A função primária da pele é servir como uma barreira protetora frente ao ambiente (Singer & Clark, 1999). A perda da integridade de grande parte da pele provocada por um ferimento originado por agentes físicos, químicos ou biológicos, como no caso de vírus, bactérias, fungos e protozoários (Calvin, 1998), ou ainda por doenças como úlceras crônicas de pele causadas pela Diabetes Mellitus podem levar a uma perda da integridade anatômica e funcional do tecido ou até mesmo a morte (Singer & Clark, 1999; Tsirogianni et al., 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004) há no Brasil cerca de 4,5 milhões de diabéticos, sendo este o 8º país do mundo com o maior número absoluto de indivíduos com esta doença; além disso, ainda segundo a OMS (2002) todos os anos no Brasil mais de 1 milhão de pessoas sofrem queimaduras.

O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma (Schirato et al., 2006). Deve-se ressaltar existir uma diferença entre regeneração tecidual e cicatrização. A primeira envolve a reconstituição dos componentes teciduais de forma idêntica aqueles destruídos; a cicatrização, pelo contrário, é uma resposta fibroproliferativa, na qual os anexos epidérmicos não se regeneram e mantêm uma cicatriz de tecido conjuntivo em lugar da rede mecanicamente eficiente de colágeno na derme não ferida. Porém, em feridas muito superficiais, o epitélio é reconstituído e pode haver pouca formação cicatricial (Robbins & Cotran, 2005).

Segundo Digelmann & Evans (2004) um tecido que sofreu algum tipo de lesão pode apresentar um dos seguintes tipos de reparação tecidual: i, reparação normal, resposta na qual há o restabelecimento do equilíbrio anatômico-funcional do tecido, fato esse que ocorre na maior parte dos traumas em humanos; ii, cicatrização excessiva, em que ocorre uma excessiva deposição de tecido conjuntivo, o que resulta na alteração da estrutura tecidual, com perda da sua função, a exemplo das quelóides e as cicatrizes hipertróficas; iii, a cicatrização deficiente opõe-se à cicatrização excessiva, havendo uma deposição insuficiente de tecido conjuntivo, o que resulta em um tecido enfraquecido, o qual pode-se romper. Úlceras crônicas não-cicatrizadas são exemplos dessa disfunção; iv, regeneração, processo no qual ocorre à perda anatômica-funcional

do tecido, porém é possível restaurá-lo exatamente igual a antes da formação da lesão. Formas menores de vida como os caranguejos e as salamandras são capazes de realizar esse processo.

As lesões cutâneas normalmente cicatrizam de uma maneira ordenada e eficiente, sendo este processo didaticamente dividido nas seguintes fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular ou maturação (Figura 1) (Singer & Clark, 1999; Clark, 2001; Diegelmann & Evans, 2004; Branski et al., 2005; Shimizu, 2005; Kurokawa et al., 2006; Laurens et al., 2006). A transição entre essas fases é bastante sutil, uma vez que as mesmas se sobrepõem e esta categorização didática é de certa forma arbitrária.

Sabe-se que o sistema imunológico participa de forma ativa do fenômeno da cicatrização. Tradicionalmente a resposta imunológica tem sido dividida em imunidade inata e adquirida. A imunidade inata fornece a primeira linha de defesa frente a materiais estranhos presentes no sítio da injúria, sejam eles células, constituintes celulares ou microrganismos. Seus componentes principais são as células fagocitárias como os neutrófilos, macrófagos, células Natural Killer (NK) e as proteínas do sistema complemento. Já a imunidade adquirida constitui a segunda, porém a mais eficiente e específica resposta frente aos antígenos. Ela é subdividida em imunidade celular, a qual é mediada pelos linfócitos T que secretam citocinas e a imunidade humoral, mediada pelos linfócitos B que sintetizam os anticorpos (Medzhitov & Janeway, 2000). Segundo Diegelmann & Evans (2004), as citocinas apresentam uma massa molecular média que varia entre 4 e 60 KD e determinam a ativação celular, mesmo quando estão presentes em quantidades muito pequenas. Em geral, são fatores muito estáveis, entretanto em ambientes de feridas crônicas há o aumento no número de neutrófilos liberando enzimas proteolíticas, as quais levam a destruição dessas citocinas.

Entre as células citadas anteriormente, os macrófagos desempenham um papel fundamental no fenômeno imunológico que ocorre durante o processo de cicatrização. Essas células não só “orquestram” o início da reação inflamatória, fagocitando tecidos mortos ou materiais estranhos presentes no sítio da injúria, mas também produzem moléculas que participam ativamente dos mecanismos de reparação tecidual (Tsirogianni et al., 2006).

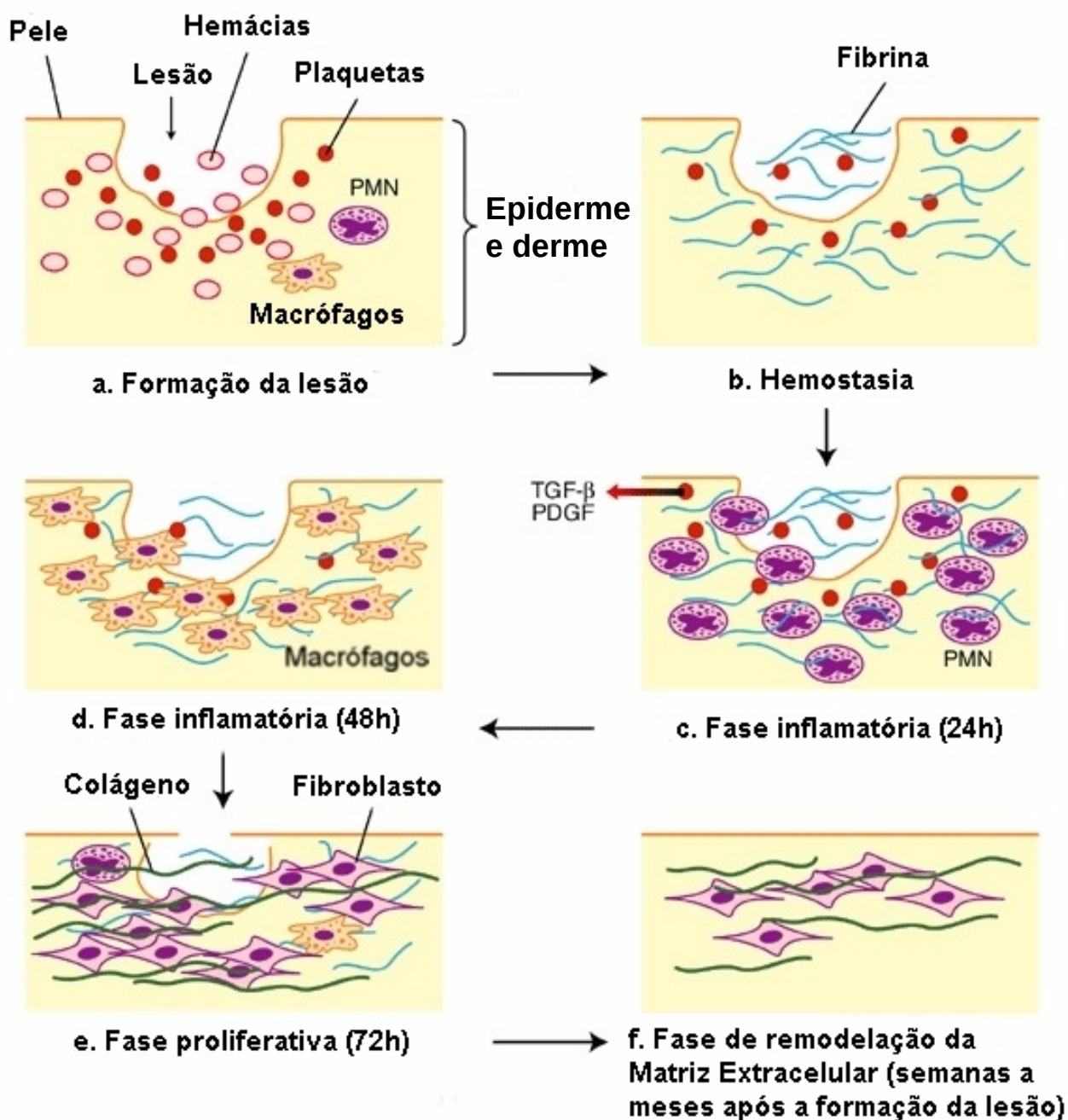


Figura 1. Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine* ©, 2003. Cambridge University Press.

O primeiro evento que ocorre no processo de cicatrização é o controle da hemorragia na área lesionada ou hemostasia (Laurens et al., 2006), uma vez que a lesão tecidual causa o rompimento dos vasos sanguíneos com a conseqüente liberação dos seus constituintes, ainda que este sangramento não seja observado macroscopicamente

no leito da lesão (Clark et al., 1998). A própria lesão endotelial ativa as plaquetas que iniciam a formação de um tampão plaquetário, o qual é o processo hemostático inicial que pára o sangramento. Em paralelo, a cascata de coagulação é iniciada, o que resulta na conversão do fibrinogênio em uma rede de fibras de fibrina insolúveis (Santoro & Gaudino, 2005; Laurens et al., 2006), fornecendo dessa maneira uma matriz extracelular (MEC) provisória para a migração celular (Diegelmann & Evans, 2004).

Segundo Robbins & Cotran (2005) e Santoro & Galdino (2005), as plaquetas além de facilitarem a formação do tampão plaquetário, também secretam fatores de crescimento e citocinas, dentre os quais os dois mais importantes são o Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF) e o Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF- β) (Diegelmann & Evans, 2004). O PDGF inicia a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos, células musculares lisas e dos fibroblastos e, além disso, também estimula a mitogênese dos fibroblastos e das células musculares lisas. Já o TGF- β , além de atrair os macrófagos, também estimula os mesmos a secretarem citocinas adicionais como FGF (Fator de Crescimento dos Fibroblastos), IL-1 (Interleucina-1) e o próprio PDGF (Diegelmann & Evans, 2004).

À medida que a hemostasia vai-se concluindo, a resposta inflamatória é iniciada (Moore, 1999; Tsirogianni et al., 2006). Clinicamente observam-se alguns sinais típicos da inflamação (edema, hiperemia, calor e dor), de acordo com Diegelmann & Evans (2004). No universo microscópico, os neutrófilos são os primeiros tipos celulares sanguíneos a se apresentarem na área da lesão, poucos minutos após a sua formação, devido à quimiotaxia por mediadores liberados pelas plaquetas (especialmente o PDGF e o TGF- β), células pertencentes ao sistema imune (principalmente os macrófagos), microrganismos ou ainda devido à ativação do sistema complemento (Park & Barbul, 2004; Szpadarska & Dipietro, 2005; Tsirogianni et al., 2006).

Quantitativamente, o pico de neutrófilos na lesão ocorre aproximadamente 24 h após a sua formação, e a sua função principal é fagocitar o material estranho e os microrganismos presentes no sítio da lesão (Tsirogianni et al., 2006). Segundo Martin (1997) e Werner & Grose (2003) além de sua função fagocitária, os neutrófilos possuem ação pró-inflamatória devido à liberação de citocinas que ativam os fibroblastos e as células epiteliais (queratinócitos).

Caso a ferida não esteja severamente infectada, em poucos dias o número de neutrófilos diminui devido à fagocitose realizada pelos macrófagos. Desta maneira,

depois de um ou dois dias, monócitos teciduais infiltram-se no local da lesão e diferenciam-se em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório, realizando um debridamento no local da injúria, processo esse facilitado pela fagocitose e pela produção de enzimas como a colagenase e elastase (Park & Barbul, 2004; Szpaderska & Dipietro, 2005). Seu efeito antimicrobiano ocorre também devido à liberação de oxigênio, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio no local da lesão (Schäffer et al., 2004). Segundo Diegelmann & Evans (2004), a presença dos macrófagos no local da injúria indica que a fase inflamatória está aproximando-se do seu fim e consequentemente a fase proliferativa está sendo iniciada.

O surgimento do tecido de granulação, a reepitelização e a contração da ferida ocorrem durante a fase proliferativa, os quais desempenham papéis importantes na cicatrização normal (Regan & Barbul, 1994). O tecido de granulação inicia o preenchimento no local da lesão 2 ou 3 dias depois da sua formação, onde esse tecido nada mais é do que o próprio tecido conjuntivo, o qual recebe essa denominação devido a sua aparência granular, a qual apresenta inúmeros capilares (Werner & Grose, 2003).

O tecido de granulação é composto pelas células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e pela nova MEC. Nessa fase, os macrófagos liberam PDGF, TGF- β e o FGF, que estimulam a proliferação e migração dos fibroblastos para o local da lesão, sendo estes fibroblastos as células predominantes nessa fase da reparação tecidual (Tsirogianni et al., 2006), iniciando a síntese e secreção de componentes da MEC, como os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e as fibras colágenas do tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese ou neovascularização da ferida) (Regan & Barbul, 1994; Steed, 1997). Esses novos vasos permitem a passagem de nutrientes e oxigênio para dentro do espaço extravascular, o que é importante para manter a atividade metabólica das células presentes nessa nova MEC. Assim, o tecido de granulação é, com frequência, edemaciado (Robbins & Cotran, 2005).

Devem-se ressaltar dois papéis significativos desempenhados pelos fibroblastos infiltrados na área da lesão: i, produzir e depositar grande quantidade de elementos da MEC, principalmente fibras colágenas do tipo I e III, que aumentam a força tênsil da lesão contribuindo para o fechamento da mesma (Carvalho, 2002); ii, Diferenciar-se em miofibroblastos, os quais apresentam feixes compostos por microfilamentos de actina dispostos ao longo do citoplasma, cuja função primordial é promover a contração das

margens da ferida, alinhando-se a elas e unindo-as (Thomas et al., 1995; Moulin et al., 2000; Gomathi et al., 2003).

O estímulo responsável pela angiogênese está relacionado à liberação de diversos fatores de crescimento como o FGF, liberado pelos macrófagos e pelas células endoteliais danificadas e o VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial), secretado pelos macrófagos e queratinócitos (Tsirogianni et al., 2006). Alguns peptídeos, a exemplo do TGF- β não causam mitose nas células endoteliais, porém são importantes durante a angiogênese, uma vez que provocam a entrada de células inflamatórias pró-angiogênicas no local da lesão (Arbiser, 1996).

Outro evento importante que ocorre nesse período é a reepitelização, iniciada pela migração das células epiteliais, desde as margens da ferida (Carvalho, 2002). Na pele íntegra, essas células epiteliais estão ligadas à membrana basal, porém quando ocorre à lesão cutânea, elas sofrem alterações fenotípicas incluindo a perda dos desmossomas e hemidesmossomas para poder restabelecer uma fina membrana basal. Os mecanismos responsáveis pela migração e proliferação dessas células durante a reepitelização ainda não foram completamente elucidados, porém há algumas hipóteses como a ausência de células vizinhas na margem da ferida ou o efeito de “margem livre”, o qual pode ser um sinal para a migração e proliferação dessas células epiteliais. Uma vez finalizado esse processo, esses queratinócitos readquirem as suas características fenotípicas normais (Singer & Clark, 1999).

Desta maneira, com o passar do tempo (5º dia), a MEC provisória é gradualmente substituída por uma matriz colagenosa, uma vez que as fibras colágenas tornam-se mais abundantes e começam a unir a incisão (Singer & Clark, 1999).

O processo de remodelagem da cicatriz envolve a contínua síntese, degradação, agregação e orientação das fibras de colágeno (Singer & Clark, 1999). A remodelação ocorre durante a fase final do processo reparatório e pode continuar durante alguns meses, observando-se síntese, depósito, contração e remodelação da MEC neoformada. Os fibroblastos continuam a ser as “células-chave” neste processo, pois estes migram até o local da lesão de forma dependente da ativação por enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases (MMPs), as quais são enzimas que controlam a degradação do colágeno na lesão, sendo secretadas pelos macrófagos, células epidérmicas e endoteliais, assim como pelos fibroblastos (Singer & Clark, 1999; Naito & Yoshikawa, 2005). Essas MMPs desempenham importante função na remodelação proteolítica da MEC em vários processos fisiológicos, incluindo a morfogênese

tecidual, reparação tecidual e angiogênese (Kahari & Saarialho-Kere, 1997; Wong et al., 2002). As MMP-2 e MMP-9 são as duas proteases gelatinolíticas mais atuantes no processo cicatricial (Kahari & Saarialho-Kere, 1997; Armstrong & Jude, 2002). Gradativamente, os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos resultando em uma configuração mais regular, a qual está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal. Em resultado ao processo de remodelação, a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação. O tipo de colágeno secretado inicialmente, na fase proliferativa, era do tipo III o qual é substituído por colágeno do tipo I, por degradação proteolítica posterior (Stevens & Lowe, 1996), resultando, assim, no aumento da resistência da cicatriz.

Posteriormente, a cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrótica acrescida de fibras colágenas. O tecido de granulação é substituído por uma cicatriz relativamente acelular, pois as células sofrem apoptose. Os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas sofrem regeneração limitada; a coloração da cicatriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficitária (Dipietro & Burns, 2003).

Vale ressaltar que podem ocorrer variações significativas na natureza, composição e duração das fases em diferentes feridas, dependendo do local onde se encontra o tecido, do grau de contaminação e infecção bacteriana, da irrigação sanguínea e da extensão da lesão ao tecido (Singer & Clark, 1999; Carvalho, 2002). Além disso, o tecido cicatrizado nunca alcança a mesma resistência do tecido ileso, assim, a força máxima atingida por uma cicatriz é no máximo 70% que a apresentada por uma pele não ferida (Singer & Clark, 1999).

Segundo Johnston (1990), a melhor conduta para favorecer a cicatrização de uma ferida é a remoção de fatores inibitórios, bem como a correção de deficiências nutricionais. É importante lembrar que uma série de agentes tópicos, tais como anti-sépticos, antibióticos e curativos exercem algum efeito no local da lesão, sendo em alguns casos tão adversos que prejudicam a cicatrização. Anti-sépticos e determinadas substâncias químicas destroem bactérias, mas também lesam as células corporais; por outro lado, soluções salinas isotônicas não têm atividade sobre as bactérias (Johnston, 1990; Swaim & Henderson, 1997).

É de conhecimento comum através de séculos de observações clínicas, que a infecção de feridas compromete o processo cicatricial. Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e, se não forem adequadamente tratadas podem ocasionar infecções

sistêmicas, como sepsis que poderia acarretar a morte do paciente (Bikowski, 1999). As infecções secundárias de pele são freqüentemente causadas pela flora transitória, composta principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes*. A infecção compromete a reepitelização e aumenta a deposição de colágeno, porém pouco se sabe a respeito da interferência da infecção na migração e na maturação da nova epiderme após a formação da lesão (Singer & McClain, 2002; Inngjerdinger et al., 2004). As feridas não cicatrizam enquanto estiverem clinicamente infectadas, portanto, esse diagnóstico de infecção exige em alguns casos a drenagem de exsudatos, com o objetivo de ocasionar o aumento do suprimento sanguíneo adequado (Morison et al., 1997). A cicatrização não pode ocorrer até que todo material estranho resultante do processo inflamatório seja removido do leito das feridas (Bergstrom et al., 1995).

2. Biomaterial

Os produtos medicinais de origem natural têm sido amplamente utilizados no tratamento de certas doenças pela população, porém poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de atribuir a estes os seus efeitos terapêuticos. Há relatos que elementos existentes na natureza poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local das lesões, já que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto pelo homem como em animais são onerosos (Silva, 2000).

Definidos como modificadores da resposta biológica, alguns tipos de biomateriais têm sido amplamente utilizados devido aos seus efeitos imunoestimulantes (Mitchell, 1988). Esses materiais biológicos têm sido objeto de pesquisas científicas devido a sua disponibilidade na natureza e por sua biodegradabilidade (Spector, 2001), além de conduzirem e acelerarem fenômenos de ocorrência natural como à regeneração de tecidos na cicatrização das lesões. Na área dos biomateriais, em sua constante evolução científica, tem-se investigado novos materiais que apresentam um conjunto de propriedades que permitem o desempenho e aplicações não atingidas pelos materiais ditos convencionais ou tradicionais (Bento, 2000).

Segundo Spector (2001), na reabilitação de lesões podem-se utilizar os biomateriais, os quais são definidos como qualquer molécula que tenha a capacidade de interagir com o sistema biológico sem induzirem uma resposta adversa no hospedeiro. Nesse contexto, há na literatura evidências farmacológicas pré-liminares que algumas

lectinas específicas para glicose-manose, como as extraídas de *Cratylia mollis*, *Parkia pendula*, *Canavalia ensiformis*, *Dioclea violacea* e *Canavalia brasiliensis* atuam como prováveis biomateriais potencializando a resposta imune do paciente frente ao processo de cicatrização cutânea experimental (Porto et al., 2006; Melo et al., 2003; Schirato, 2006).

3. Lectinas: Proteínas versáteis

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível (Sato et al., 2000; Hong et al., 2001; Souza et al., 2001), na qual a principal força de interação é a hidrofobicidade (Kennedy et al., 1995).

A ênfase que é dada quanto à origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas não são apenas encontradas em animais, mas também em outros organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (Moreira et al., 1991).

As lectinas estão presentes em todas as classes e famílias de organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), bactérias e em vírus. Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas vegetais é obtida da semente, principalmente em leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. As lectinas constituem cerca de 10% das proteínas totais da semente, porém a quantidade isolada é pequena variando entre 0,1-1% deste total (Loris, 2002; Sharon & Lis, 2004; Alencar et al., 2005).

O papel fisiológico das lectinas de plantas não está claramente definido, mas o crescente estudo sugere que são proteínas de defesa que podem protegê-las contra ataques de predadores como vírus, fungos e insetos (Cavada et al., 1998; Ratanapo et al., 2001; Sacchettini & Brewer, 2001). Existem várias outras hipóteses sobre o papel fisiológico das lectinas de plantas como, por exemplo, reconhecimento celular,

simbiose, estoque de proteínas (Van Damme et al., 1997) e também na estimulação da proliferação e crescimento celular da planta (Wititsuwannakul et al., 1998).

Pelo fato das lectinas aglutinarem eritrócitos, a sua presença pode ser detectada através de ensaio de hemaglutinação, no qual uma diluição seriada da lectina é efetuada antes da incubação com eritrócitos humanos ou de outros animais (Sharon e Lis, 2001). A aparente aglutinação de eritrócitos não é suficiente para comprovar a presença de lectina, pois alguns agentes, como taninos, certos lipídeos ou cátions divalentes em altas concentrações podem promover este efeito (Rüdiger, 1998). É necessário realizar ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH), com carboidratos, o qual define, também, a especificidade da lectina para monossacarídeo simples ou carboidratos complexos (Correia e Coelho, 1995).

A cromatografia de afinidade ocupa uma posição ímpar na tecnologia de separação de proteínas e, de acordo com a especificidade da lectina, têm sido escolhidas diferentes matrizes de afinidade comercialmente disponíveis. Lectinas específicas para glicose-manose ou seus derivados podem usar como matrizes de afinidade Sephadex (polímero de dextrana), com diferentes limites de exclusão (Correia e Coelho, 1995; Cavada et al., 1998); aquelas com especificidade para N-acetil-D-glicosamina e seus oligossacarídeos, ou derivados de quitina, podem ter quitina como matriz de afinidade (Freire et al., 2002; Wang & Ng, 2003); as específicas para galactose e seus derivados podem ser purificadas utilizando agarose (Nicolson e Blaustein, 1972), Sepharose (Anuradha e Bhide, 1999), Sepharose tratada com ácido (Jimbo et al., 2000), guaran (Coelho e Silva, 2000), bem como Sepharose conjugada com glicoproteínas (Gerlach et al., 2002).

As lectinas, por suas propriedades características, são importantes ferramentas em pesquisas na área da Bioquímica, da Biologia Celular, da Medicina, da Imunologia e áreas relacionadas. Sabe-se, que as lectinas possuem ação pró-inflamatória. Algumas destas induzem a proliferação de linfócitos, atuando como agente mitogênico útil para o estudo da interação da lectina com células linfocitárias *in vitro* (Kilpatrick, 1999). A porção sacarídica do receptor de células T (TCR) é provavelmente um sítio específico de ligação com a lectina, promovendo sua ativação e conseqüente proliferação (Maciel et al., 2004).

Em estudos recentes, com lectinas, foi observado: a indução de apoptose em tumores de células humanas (Karasaki et al., 2001); atividade antibacteriana (Gaidamashvili & Standen, 2002, Tasumi et al., 2004); atividade antifúngica (Freire et

al., 2002; Wang & Ng, 2003); inibição da proliferação de fibroblastos oculares e contração de colágeno (Batterbury et al., 2002); produção dos chamados medicamentos inteligentes, onde estes diferem dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo provocado pela quimioterapia (Woodley, 2001); atividade mitogênica (Banerjee et al., 2004). A afinidade das lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada para a caracterização epidemiológica da *Neisseria gonorrhoeae* e diferenciação de outras espécies de *Neisseria* (Wu et al., 2001). Vários trabalhos mostraram que determinadas bactérias produzem lectinas específicas para certos carboidratos, e fazem uso das mesmas para se aderir ao tecido hospedeiro como primeiro passo em um processo infeccioso. Ao submeter o organismo infectado com a bactéria a injeções de carboidratos, a colonização é reduzida devido à diminuição de sua adesão ao tecido, sendo o bloqueio aos locais de ataque das bactérias, um caso claro de terapia antiadesiva contra doenças microbianas. Esta forma de aplicação das lectinas é alvo de intensas pesquisas pelas indústrias farmacêuticas como método contra infecções (Sharon & Lis, 2001, Rudiger et al., 2000).

Várias lectinas com especificidade glicose-manose, têm se destacado por serem consideradas possíveis biomateriais frente à cicatrização experimental. Dentre elas, merecem destaque aquelas pertencentes à divisão Angiospermae, família Leguminosae, como a *Cratylia mollis*, *Parkia pendula*, *Canavalia ensiformis*, *Dioclea violacea* e *Canavalia brasiliensis* (Porto et al., 2006; Melo et al., 2003; Schirato, 2006).

4. Lectina de *Eugenia malaccensis*

A ordem Myrtales, pertencente a divisão Angiospermae, possui cerca de 17 famílias, dentre as quais a família Myrtaceae, a qual possui cerca de 140 gêneros, mais de 3000 espécies, sendo a maior família da ordem, com dois grandes centros de dispersão, nas Américas e Austrália (Joly, 2002; Ribeiro, 1999). É considerada uma das mais complexas famílias da flora brasileira do ponto de vista taxonômico, devido a escassez de estudos taxonômicos (Souza & Lorenzi, 2005). Várias espécies dessa família, principalmente as nativas do Brasil, têm frutos comestíveis, tais como goiaba (*Psidium guajava*), araçá (*P. cattleianum*), jabuticaba (*Myrcia cauliflora*), entre outras (Joly, 2002).

O gênero *Eugenia* figura entre os mais importantes na família Myrtaceae, onde a espécie mais conhecida dentro deste gênero é a *Eugenia malaccensis* L. (Figura 2), conhecida popularmente no Brasil como jambo vermelho, jambo roxo ou jambo encarnado, o qual faz parte das plantas consideradas medicinais, sendo utilizada principalmente pelas populações de baixo poder aquisitivo (Campelo, 1988).

O jambeiro (que produz o jambo) é uma árvore conhecida e bem adaptada às condições do nordeste do Brasil. Chega a mais de 16 m de altura, com copa de forma cônica, densa e com ramificação abundante. Possui folhas de cor verde-brilhante, flores grandes, aromáticas, que quando caem, formam sob as árvores um lindo tapete púrpureo, e podem variar de brancas a róseo-púrpúreas de acordo com a espécie. O jambo é uma fruta de aparência exótica, de casca bem fina, forma ovóide, vermelho por fora e muito alvo por dentro, tem um sabor doce e a polpa, apesar de consistente, é muito suculenta e envolve sementes globosas. O jambeiro é reconhecido como uma árvore de muita beleza e boa sombra, desenvolvendo-se em qualquer tipo de solo, desde que permeáveis e profundos. É cultivado em quase todo Brasil, em regiões de clima quente e úmido. A propagação se dá por sementes. Pode produzir por mais de 20 anos, frutificando de janeiro a maio. Estima-se ocorrer grandes perdas de jambo na época da safra, em virtude da alta produtividade, do curto período da safra e da pequena vida útil do fruto *in natura* (Joly, 2002).

Em diversas partes do mundo tem sido empregado na medicina popular para o tratamento de diabete, tosse, dor de cabeça, inflamações e hipertensão (Morton, 1987). Locher et al. (1995) estudaram a atividade biológica de 73 extratos de 16 plantas *in vitro*, dentre estas, os extratos da folha e da casca da *E. malaccensis*, os quais apresentaram atividade anti-viral frente ao vírus herpes simples 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) e anti-bacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Esta espécie também apresentou uma atividade antifúngica, porém em menor potencial quando comparada às outras espécies estudadas.

A lectina de sementes *E. malaccensis* (EmaL) tem sido investigada no Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A EmaL pertence ao grupo de lectinas glicose-manose, ao qual Con A (uma das lectinas mais bem estudada) pertence. No entanto, EmaL apresentou características distintas àquelas apresentadas por este grupo e demonstrou ser um potente agente antimicrobiano *in vitro*

contra microorganismos patógenos ao homem como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium* sp. e *Klebsiella* sp. (Brustein et al., 2006).



Figura 2. Visão geral da planta *Eugenia malaccensis*: Frutos (a) e as sementes (b).
Fonte: www.frucafe.com.br/.../jambo_vermelho_fruta2.jpg

JUSTIFICATIVA

Compreender o processo cicatricial é de grande importância para a avaliação evolutiva da ferida e fundamental para um diagnóstico correto a respeito da fase em que esse processo se encontra e conseqüentes medidas terapêuticas que podem ser prescritas para o tratamento ideal da lesão.

As lectinas vêm sendo amplamente utilizadas em pesquisas biológicas devido ao seu grande potencial médico e biotecnológico. Pesquisas existentes com extratos da espécie *E. malaccensis* revelam diversas propriedades biológicas dos mesmos, como atividades anti-viral, antifúngica e anti-bacteriana *in vitro*. Além disso, a EmaL demonstrou ser um potente agente antimicrobiano contra microorganismos patógenos ao homem. Vale ressaltar também o fato dessa espécie ser bastante difundida em todo o Brasil.

Segundo Spector (2001), os biomateriais podem ser utilizados na reabilitação de lesões. Desta maneira, considerando que a interação das lectinas com receptores glicídicos da membrana celular é a base molecular para várias respostas induzidas por essas proteínas nos mais diversos sistemas biológicos (Isidro *et al.*, 2001), avaliar a

atividade da EmaL *in vivo* frente ao processo cicatricial é importante, uma vez que, lectinas glicose-manose têm-se apresentado como promissores agentes cicatrizantes.

OBJETIVO

1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da lectina de sementes de *Eugenia malaccensis* (EmaL) frente ao tratamento tópico diário sobre a cicatrização cutânea em camundongos.

1.2 Objetivos específicos

1.2.1 Acompanhar a evolução do processo de reparo do ponto de vista clínico (avaliação clínica das feridas e mensuração de sua área) durante 12 dias.

1.2.2 Avaliar microbiologicamente as feridas tratadas com a EmaL/NaCl após cirurgia (dia 0) e no momento das biópsias (2^o, 7^o e 12^o dias de pós-operatório).

1.2.3 Acompanhar a cicatrização do ponto de vista histopatológico, através de biópsias realizadas nos 2^o, 7^o e 12^o dias de pós-operatório.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIOLOGICALS



EVALUATION OF THE TOPICAL TREATMENT WITH THE LECTIN FROM *Eugenia malaccensis* IN THE CUTANEOUS HEALING IN MICE

Fernanda V. Souza-Araújo¹; Vanessa P. Brustein¹, Flávio O. Silva²,
Rosângela V. S. Araújo², Luana C. B. B. Coelho¹, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{1,2},
Ana M. A. Carneiro-Leão², Maria T. S. Correia^{1*}.

¹Departamento de Bioquímica – Laboratório de Glicoproteínas, Universidade Federal de Pernambuco – Brasil, ² Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

Abstract

The EmaL lectin was extracted from *Eugenia malaccensis*, important specie of the Myrtaceae family. Aiming at to evaluate the influence of the topical treatment with the EmaL in the cutaneous healing process, a wound was surgically produced in the dorsal region (1cm²) in female albino Swiss (*Mus musculus*) mice (n = 15/grupo) and daily treated with 10 µg of EmaL and 150 mM NaCl during 12 days. In the daily clinical evaluation it was found that the wounds treated with the EmaL presented inflammatory signals as edema ($\chi^2 = 3.63$; $p < 0.05$) and hyperemia ($\chi^2 = 2.66$; $p < 0.05$) statistically less intense when compared to the control. On the 12th post surgical day, the wounds treated with the lectin and the group control presented an average area of 0.02 ± 0.01 cm² and 0.02 ± 0.02 cm², respectively. Biopsies for histopathology analysis and microbiologic examinations were carried out on the 2nd, 7th and 12th days. The microbiological analysis of the wounds evidenced only the growth of *Staphylococcus* sp. From the histopathological point of view, on the 12th day, the injured tissue treated with EmaL presented reepithelization (complete or partial) and areas of transition more evidenced than those of the control group, especially due to well organized pattern of collagen fibres presented in the granulation fibrous tissue. The present study suggests a preliminary pharmacological evidence for the use of the EmaL in the repairing process of cutaneous wounds.

Keywords: Lectin, *Eugenia malaccensis*, cutaneous wound, wound healing.

*Corresponding author: Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-3271.8354; E-mail address: terezacorreia@hotmail.com

1. Introduction

The primary function of the skin is to serve as a protective barrier against the environment [1]. The loss of the integrity of great part of the skin due to a wound originated by physical, chemical or biological agent, as in the case of virus, bacteria, fungi and protozoans [2], or still due to illness like chronic ulcers of skin caused by the Diabetes Mellitus can even though take to a loss of the anatomical and functional integrity of the tissue or even to the death [1, 3].

The cutaneous injuries normally heal in a commanded and efficient way, being this process divided in the following phases: hemostasis, inflammatory phase, proliferate phase or of granulation and remodeling of the extracellular matrix (ECM) or maturation [1, 4 - 9]. It is important to stand out that significant variations in the nature, composition and duration of these phases in different wounds can occur, depending on the place where the tissue is, contamination degree and bacterial infection, sanguine irrigation and extension of the injury to the tissue [1].

It is a common knowledge through centuries of clinical comments, that the infection of wounds compromises the wound healing. Infected wounds heal more slowly and, if they will not be treated adequately could cause systemic infections, as sepsis that could cause the death of the patient [10]. The secondary infections of skin frequently are caused by the transitory flora, composed mainly for *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pyogenes*. The infection compromises the reepitheliazation and increases the collagen deposition [11, 12].

According to Spector [13], in the rehabilitation of injuries can be used the biomaterials, which are defined as any molecule that has the capacity to interact with the biological system without inducing an adverse reply in the host. In this context, one can find in literature preliminary pharmacologicals evidences that some specific lectins for glucose-mannose like from *Cratylia mollis*, *Parkia pendula*, *Canavalia ensiformis*, *Dioclea violacea* and *Canavalia brasiliensis* act as probable biomaterials improving the mice immune reply in the experimental process of cutaneous healing [14, 15, 16].

Eugenia malaccensis L. (Angiospermae division, Myrtaceae family) [17, 18] is popularly known in Brazil as *jambo*, which is part of the considered medicinal plants, being mainly used for the populations of low purchasing power [19]. In diverse parts of the world it has been used in the popular medicine for the treatment of diabetes, cough, head ache, inflammations and hypertension [20]. Extracts of *E. malaccensis* showed

selective anti-viral activity against Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) and 2 (HSV-2), anti-fungal activity and anti-bacterial activity against *S. aureus* e *S. pyogenes* [21].

The lectin from *E. malaccensis* (EmaL) seeds belongs to the group of lectins glucose-mannose, to which Con A (one of the lectins most studied) belongs however, it has distinct characteristics to those presented by this group and demonstrated to be a powerful anti-microbial agent against pathogenic microorganisms for human kind as the *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium* sp. and *Klebsiella* sp. [22].

The aim of this work was to evaluate the effect of the lectin from *E. malaccensis* (EmaL) seeds in the daily topical treatment of the experimental cutaneous healing in mice.

2. Materials and methods

2.1 Lectin from *E. malaccensis*

The lectin was purified according to Brustein et al. [22]. The lectin was purified from a 10% (w/v) seed extract in 0.15 M NaCl (crude extract, CE). In brief, proteins were precipitated using 0-80% ammonium sulphate fractionation (F 0-80), followed by affinity chromatography in Sephadex G-50 column. The column was equilibrated and developed with 0.15 M NaCl at 10 ml/h; bound proteins were biospecifically eluted using 0.3 M glucose in 0.15 M NaCl and dialyzed in 0.15 M NaCl (EmaL). Hemagglutinating activity (HA) was evaluated in the presence of rabbit erythrocytes. Protein concentration was determined according to the method of Lowry et al. [23] and samples were stored at -20 °C.

2.2 Surgical protocol and experimental groups

Adult females albino Swiss mice (30) were used (age 35-45 days, weight 25 ± 2 g), from the Biotery of the Laboratory of Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), University Federal Pernambuco (UFPE). Each animal was maintained in an individual cage, with water and commercial food *ad libitum* (Labina®).

After hydric and alimentary jejune of 12 hours, the animals were weighed and intraperitoneally anaesthetized with 2 % xilazine chloridate (10 mg/Kg) and 10 %

ketamine chloridate (115 mg/Kg) [24]. After anaesthesia were carried out the trichotomy and the antiseptis of dorsal thoracic region with 1 % iodopovidone and 70 % ethanol. The sterilized cloths of field were located and fixed in the skin of the animal. With the help of a leaked metallic mold (diameter = 1.0 cm), the skin was demarcated with dermatographic pen.

The cutaneous wound was produced by the incision of the skin with a scissors with fine-fine shears of tips and clamp of dissection, until its recession. The hemostasis of the area, when necessary, it was carried out by digital compression. The animals were divided into two groups (n=15/group) and the wounds were daily treated with 100µl of the following solutions: 0.15M NaCl and 100µg/ml EmaL.

2.3 Clinical evaluation and contraction of wounds

The clinical characteristics of experimental wounds were evaluated every 24 h after surgery (AS), taking into consideration the following aspects: edema, hyperemia, secretion, bleed, crust, granulation and scar tissues. Daily, the measurement of wound areas were calculated, starting from borders of wounds, using the equation $A = \pi.R.r$ (A = wound area; R and r the large and smaller radii of wound, respectively) [25]. The calculation of the contraction degree was express in percentage using the mathematical equations proposed by Ramsey [26], $100 \times (W_0 - W_i)/W_0 = M \pm DP$ (W_0 = initial area of the wound; W_i = area of the wound in the day of the biopsy; M = average; SE: Stand Error).

2.4 Histopathological analysis

On the 2nd, 7th and 12th days after surgery wound biopsies were accomplished (n=5/group). After anaesthesia, as previously described, samples (fragments of the transition area between complete and wounded skin) and wounded skin) were collected. Immediately after the withdrawal of the skin, the samples were putted above on a filter paper and settled in formaldehyde 4% (v/v) prepared in PBS 10mM pH 7.2 and after submitted to the histopathology's procedures. Each fragment of skin was dehydrated in crescent concentrations of ethanol, dehidratisation in xylol and unblocked in paraffin. After microtomy (5µm), the slices had been stain with Trichromic of Masson.

2.5 Microbiological evaluation

The microbiological evaluation was carried out through collections by means of "Swabs" after surgery (day 0) and at the moment of the biopsies (2nd, 7th and 12th days AS). When contaminated, the material was sown in plates of Petri containing agar nutrient and incubated in a bacteriological greenhouse at 37 °C for 24 hours. The bacteria had been identified through the morphologic aspects of the colonies and staining pattern of the Gram.

2.6 Statistical analysis

To the data analysis was utilized statistical tests trough the software Statistic 6.0. The homocedasticity of the variance was verified trough of the Levene's test. After, aiming to determine if the area of contraction of the lesion was significantly different among the days of analysis, were utilized Analysis of Uni – factorial Variances (One way Anova). Posteriori, to determine between which groups were observed the the significantly difference, the Tukey test was utilized, beyond that, was utilized the chi-square test to evaluate possible significant differences in the other clinic characteristics as: edema, hyperemia, first and second crust, granulation and scar tissue. For the tests and analysis, the level of significance adopted to rejected the (Ho) were 5% ($\alpha=0,05$).

3. Results

3.1 Clinical Evaluation

The clinical evaluation was carried out until the 12th day after surgery (AS). The macroscopic evaluation of the healing process was followed clinically through the presence of edema, hyperemia, crust formation, granulation tissue and by morphometric parameters (measurement of the injury areas). The temporal evolution of these macroscopic aspects of the cutaneous healing is demonstrated in figures 1 and 2. During the inflammatory period the presence of edema was observed in all groups. This clinical signal stayed until 6th day AS in the group of EmaL and to the control group until the 8th day AS in 25 % of the animals. Significant differences occurred on the 1st, 5th and 6th days AS in the parameter edema of the group treated with EmaL in relation to the control one with a magnitude of 24%, 10.5% and 26%, respectively ($\chi^2 = 3.63$; $p < 0.05$) (Figure 1, A and B).

Due to the dilatation of the vascular stream present in the lesion region, the hyperemia whose purpose is to increase the supplement of oxygen and nutrients to the attacked tissue was observed in 100 % of the animals treated with the EmaL until 4th day AS and extending to the 5th day AS in 80% of the animals. In this stage 11.11 % of the animals of the control group were still presenting this flogistic signal on the 6th day AS. Moreover, this inflammatory characteristic was more intense in the control group. It was found a significant difference on the 5th day AS in the EmaL group in relation to the 150mM NaCl ($\chi^2 = 2.66$; $p < 0.05$) with a magnitude of 10.7% (Figure 1, A and B).

The first crust was observed from the first day only in the group treated with the EmaL with a magnitude of 33.3 %. Between the 3rd to 5th and the 7th to 9th days AS, 100% of the animals of the EmaL group presented the first crust, situation that did not occur in the control group. A significant difference in the group treated with the EmaL in relation to the control group was occurred, on the 1st, 7th, 8th and 9th days AS with a magnitude of 33.3 %, 9.0 %, 25.0 % and 25.0 %, respectively ($\chi^2 = 2.73$; $p < 0.05$). However, the second crust, that is formed when it is complete or partial unfastening of the first crust and with the presence of remaining exudation in the injured tissue enough to dry up and consequently to form the second crust, was identified macroscopically after the 7th day in both groups (Figure 1, A and B). Over the evaluated period, the crusts of the experimental groups presented to be fine, droughts and with uniform aspect.

The presence of the granulation tissue was observed between the 5th and 7th days AS in both groups (Figure 2, A and B) and the peak in the EmaL group was gotten on the 7th day AS. In the every day in which the granulation tissue was presented a significant difference occurred in the group treated with the EmaL in relation to the control group ($\chi^2 = 2.02$; $p < 0.05$), with a magnitude of 73.0 %, 51.0 % and 47.5 % of the animals on the 5th, 6th and 7th days AS, respectively.

The evolution of the injured areas and related contraction averages are illustrated in the figure 1, A and B and figure 3. The statistical analysis by variance analysis (ANOVA) with $p \leq 0.05$ demonstrated to exist a significant difference in the average of the area contraction in the injuries of treated group with EmaL ($F_{(0.05 \text{ e } 2)} = 3.28$; $p = 0.026$) and the subsequent Tukey test ($p \leq 0.05$) confirmed that this significant difference occurred between the days 0-1, 1-2 and 2-3 ($p = 0.036$) with a magnitude of 28.0 %, 9.0 % and 14.0 %, respectively. This behavior was not observed in the control group. However, between the 4th and 12th days AS, the studied groups shown a similar profile

of contraction of the injury. In the last day of evaluation, the injuries treated with the EmaL lectin and 150 NaCl mM presented an average area of $0.02 \pm 0.01 \text{ cm}^2$ and $0.02 \pm 0.02 \text{ cm}^2$, respectively. About the presence of the scar tissue, a significant difference between the studied groups did not occur (Figure 2, A and B).

3.2 Microbiological Evaluation

The antimicrobials assays *in vivo* were carried out after surgery (zero time) and on the 2nd, 7th and 12th days AS, the same as biopsy time intervals. At the zero time any microbial growth was found showing they have been carried out in aseptic way. On the 2nd AS 20 % of the animals of control group presented the commensally bacterium *Staphylococcus* sp. which belongs to the normal microbiota of the skin, also occurred on the 7th day AS for the control group (20%) as for the EmaL (20%). On the 12th day AS, any bacterium was no longer identified.

3.3 Histopathological Analysis

The microscopically evaluation of the healing process was followed by the crust presence, infiltrated inflammatory, angiogenesis, granulation tissue and reepithelialization of lesion.

On the 2th day AS the group treated with EmaL presented a transition area between the complete skin and the injury most defined than the control group (Figure 4, A and B). In this period the treated and control groups presented similar histopathologicals characteristics, presenting crust, infiltrated inflammatory, angiogenesis or neovascularization, suggesting a beginning of vascular granulation tissue. However, it is important to point out that in the group treated with the EmaL the presence of infiltrated inflammatory was more intense and moreover occurred the presence of collagen fibers (Figure 4, A and B).

Figure 4 (C and D) demonstrates the microscopically aspects of the injuries on the 7th day AS. The transition areas of the injuries of the group treated with the EmaL were characterized for presenting a reepithelialization more extensive in direction to the center of the injury, supported by a fibrovascular granulation tissue. However in the lesion area of both groups, it was observed the presence of crust, but the granulation tissue was vascular.

During the 12th day AS, when the last biopsy was made, the reepithelialization was complete or partial in the studied groups. Macroscopicamente, nesse dia, a cicatriz

estava presente em três animais, tanto do grupo controle como do tratado de um total de n=5/group. In respect to the group treated with the EmaL, the transition areas met organized well, however difficult to visualize due to the progression of the phenomenon. Moreover, the granulation tissue was fibrous (rich in collagen), presenting some small vessels (Figure 4F). In the animals where the reepithelialization was partial, it was proven the crust presence and the granulation tissue with fibrovascular characteristics. In respect to the control group, it was observed the only the presence of granulation tissue with fibrovascular and vascular characteristics and in the other control animals where the reepithelialization was partial it was proven crust presence (Figure 4E).

4. Discussion

Natural products, known as secondary metabolites of plants or animals, continue to be an important segment on the research of new drugs. The World Health Organization (OMS) considers the phytotherapy in its health programs and suggests basic procedures for the validation of these drugs, which are in constant research in the whole world [28].

The lectins are valuable molecules with pharmacological potential. In the last years, [29 - 36], among others, has demonstrated the capacity of activation of the cells of the immune system by lectins extracted from plants. According to Park & Barbul [37], immune cells are vital to the regulation of the wound healing process through the secretion of signaling molecules, such as cytokines, lymphokines, and factors of growth.

Some lectins from the family Leguminosae with specificity glucose-mannose, are described in literature for improve the immune response front to the cutaneous healing in mice in a concentration of 100 µg/ml, among these are distinguished the lectins of *Canavalia ensiformes* (Con A) [15], *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) [15], *Canavalia brasiliensis* (Con Br) [16], *Dioclea violacea* (DVioL) [16] and *Parkia pendula* (Ppel) [14].

Important signals are used in the medicine to evaluate the gravity of the illness and the recuperation of the patient, in set with other symptoms, between them are the edema and the hyperemia [38]. Thus, in respect to these inflammatory characteristics, the results obtained in this work are in accordance with what described for the lectins with the same specificity of the EmaL [14, 16], with exception of Cramoll 1,4 that demonstrated the presence of edema until the 2nd day AS [15]. However, differently

from the glycoproteins Cramoll 1,4, Ppel and Con A, the EmaL demonstrated the presence of crust from the 1st day AS, what it is important, a time that the crust besides protecting the injury, facilitates the cellular migration, therefore it forms a provisory extracellular matrix.

After the inflammatory phase appears the granulation tissue, that grows to fill the cutaneous imperfection through a neovascularization, being this filled later for one scar tissue rich in collagen the principle of type III [39]. The period of appearance of this tissue in the EmaL group (5^o to 7^o day AS) was similar to others lectins glucose-mannose.

The EmaL demonstrated to be efficient in the contraction of the area in the injury until the 3th day AS, fact this that also occurred in the animals treated with the Con Br with a magnitude of 0.42 cm²/day. On the 12th day AS the average area of the injuries treated with the EmaL was of 0.02 ± 0.01 cm² and of 0.11 ± 0.08 cm² for the Con Br. However, in respect to the injuries treated with the Cramoll 1,4 in 10th day AS, 100% of the wounds were found to be total healed.

Vegetal lectins, especially the ones that are homologous the Con A (glucose-mannose) are capable to modulate the conscription of neutrophils for indirect mechanisms [33, 40]. Second Cavada et al. [41] the lectins possess mitogenic action. Maciel et al. [42] had demonstrated that the lectins Cramoll 1,4 and Cramoll 1 stimulate the proliferation of human lymphocytes and according to Pastor et al. [43] the T cell receptor (TCR) saccharide portion is probably the specific lectin binding site, promoting the activation and, consequently, proliferation.

Many lectins of leguminous that present the same specificity of the EmaL, have been demonstrated for stimulating pro-inflammatory effect, mediated for its linking to the sugar specific. Alencar et al. [33] studying the neutrophil migration for indirect mechanism exerted by the lectin of *Vatairea macrocarpa*, had observed that this pro-inflammatory effect does not occur when this lectin meets inhibited with galactose, its specific monosaccharide. Alencar et al. [35] had emphasized the fact of lectins glucose-mannose to be able to exert two different inflammatory mechanisms depending on its administration way, or either, anti-inflammatory effect when managed for endovenous path and pro-inflammatory effect for saw place.

Dubois et al. [44] had demonstrated the capacity of the stimulant effect of the ConA front the production of metalloproteinase-9 (MMP-9) for the lymphocytes in vitro. According to Nagase et al. [45] this MMP-9 participates of the phenomenon of

the wound healing, a time that is this proteinase responsible together with the MMP-2 for metabolizes the elastin, collagen type IV and other molecules of the ECM.

It is known that the lectins are chemoattracted by the inflammatory cells and, consequently, stimulate synthesis and secretion of several cytokines involved along wound healing process. The lectin of *Phaseolus vulgaris* (PHA) presents an excellent mitogenic activity and stimulates the secretion of cytokines involved in the cutaneous healing as IL-2, IL-5 and INF- γ [46]. One another lectin of leguminous, the Con Br, is capable to induce apoptosis and lymphocytes proliferation with INF- γ production in vitro and oxide nitric in vitro and in vivo [29, 31]. As well as this, the Cramoll 1,4 and Con A also disclose to mitogenic activity in vitro front to the human lymphocytes [42]. These similarities of biological functions can are related with the fact of the lectins of leguminous be structurally similar, which are constituted of two or four subunits, with molecular mass varying between 25KDa and 30KDa and each one of the subunits possess a linking for carbohydrate (glucose-mannose), being this dependent process of the simultaneous presence of ions Ca^{+2} and Mn^{+2} (or another transition metal) [47]. Moreover, they exhibit different pH-dependent dimer-tetramer equilibrium [48, 49]. For example, the quaternary structure of the Con A is pH- dependent, which exists as one tetramer above of pH 7.0 and as one dimer below of pH 5.0 [50].

Differently of these lectins of leguminous, the lectin studied in this work extracted from the seeds of the *Eugenia malaccensis*, a arbustive or arboreous plant, is constituted according to Brustein et al. [22] for subunits of 14KDa. Moreover, the EmaL remains active after variations of pH (2 to 8), but is sensitive to the temperature, where the same one lost its activity when was warm to 30°C during 30 minutes. Another characteristic that differentiates it of the other lectins glucose-mannose is that the EmaL does not need the presence of ions Ca^{+2} and Mn^{+2} to exert its activity and moreover, still according to Brustein et al. [22], the EmaL (0,2 mg/ml) showed antibacterial action in vitro front to the *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium* sp. and *Klebsiella* sp., showing the ability of linking of the lectin to the carbohydrate of the bacterial cellular wall, demonstrated for the total inhibition of the reaction for glucose. Already the lectins of leguminous Con A, Cramoll 1,4, Ppel, Con Br and DVioL had not presented antibacterial activity in vitro [14, 15, 16].

The difference found in this work in the intensity of the inflammatory process and in the presence of the scar tissue in the injuries treated with the EmaL, can be

caused in reply to the small biochemistry differences existing between the EmaL and the other lectins of leguminous also specific for glucose-mannose, differences these, necessary to become them biologically active. In this way, the results present offer a preliminary pharmacological evidence in the use of this lectin in the process of repairing of cutaneous wounds.

5. Acknowledgements

This paper was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. References

- [1] Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. The New England Journal of Medicine 1999; 341: 738-746.
- [2] Calvin M. Cutaneous wound repair. Wounds 1998; 10: 12-32.
- [3] Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos, HM. Wound healing: Immunological aspects. Injury 2006; 37: 5-12.
- [4] Clark RAF. Fibrin and wound healing. Ann New York Acad Sci 2001; 936: 355-367.
- [5] Diegelmann RF, Evans M. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Frontiers in Bioscience 2004; 9: 283-289.
- [6] Branski RC, Rosen CA, Verdoline K, Hebda PA. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. Journal of Voice 2005; 19: 283-289.
- [7] Shimizu T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. Journal of Dermatological Science 2005; 37: 65-73.
- [8] Kurokawa I, Mizutani H, Kusumoto K, Nishijima S, Tsujita-kyutoku M, Shikata N, Tsubura A. Cytokeratin, filaggrin, and p63 expression in reepithelization during human cutaneous wound healing. Wound healing and Regeneratio 2006; 14: 38-45.

- [9] Laurens N, Koolwijk P, De Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 932-939.
- [10] Bikowski J. Antimicrobial wound management in the emergency department: an educational supplement. *The Journal of Emergency Medicine* 1999; 17: 197- 206.
- [11] Singer AJ, McClain A. Persistent wound infection delays epidermal maturation and increases scarring in thermal burns. *Wound Repair and Regeneration* 2002; 10: 372-377.
- [12] Inngjerdinger K, Nergard CS, Diallo D, Mounkoro PP, Paulsen BS. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 233-244.
- [13] Spector M. Biomaterials. In: Achauer B, Eriksson E, Guyuron B. *Plastic Surgery, Indications, Operations, Outcomes*. Mosby Year Book; 2001, p. 239-259.
- [14] Porto CS, Melo CML, Coriolano M, Lima-Filho JL, Coelho LCB B, Correia MTS, Porto ALF, Carneiro-Leão AMA. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. In: *Caminhos da Ciência*, Recife: EDUFRPE, v. 1. 2006, p. 133-147.
- [15] Melo et al (2003). In: Porto CS, Melo CML, Coriolano M, Lima-Filho JL, Coelho LCB B, Correia MTS, Porto ALF, Carneiro-Leão AMA. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. In: *Caminhos da Ciência*, Recife: EDUFRPE, v. 1. 2006, p. 133-147.
- [16] Schirato et al (2006). In: Porto CS, Melo CML, Coriolano M, Lima-Filho JL, Coelho LCB B, Correia MTS, Porto ALF, Carneiro-Leão AMA. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. In: *Caminhos da Ciência*, Recife: EDUFRPE, v. 1. 2006, p. 133-147.
- [17] Joly AB. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 2002.
- [18] Ribeiro JELS. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA; 1999.

- [19] Campelo CR. Contribuição ao estudo das plantas medicinais no estado de Alagoas. *Acta-Amazonica-suplemento* 1988; 18: 305 – 312.
- [20] Morton J. Malay Apple. In: *Fruits of warm climates*. Morton JF, Miami FL 1987, p. 378 – 381.
- [21] Locher CP, Burch MT, Mower HF, Berestecky J, Davis H, Van Poel B, Lasure A, Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 1995; 49: 23-32.
- [22] Brustein VP, Coelho LCBB, Campos-Takaki GM, Paiva PMG, Carneiro-da-Cunha MG, Correia MTS. Purification and characterization of *Eugenia malaccensis* seed lectin with antimicrobial activity. *Biologicals* (In Review), 2006.
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193-265.
- [24] Hall LW, Clarke KW. *Veterinary anaesthesia*. 9rd ed. London: Ballière Tindall; 1991.
- [25] Prata M, Haddad C, Goldenberg S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 1988; 3: 43-48.
- [26] Ramsey D. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *American Journal. Veterinary. Research* 1995; 56: 941-949.
- [27] Carvalho F, Hazin FHV, Piercy A, Burgess G. Population structure and utilization of habitat by *Dasyatis amaricana* (Bigelow e Schroeder 1953) at the Atol das Rocas Biological Reserve, Brazil. *Bulletin of Marine Science* 2006; 71: 53-79.
- [28] Priya KS, Arumugam G, Rathinam B, Wells A, Babu M. *Celosia argentea* Linn. Leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. *Wound Rep Reg* 2004; 12: 618-625.
- [29] Andrade JL, Arruda S, BarbosA T, Paim L, Ramos MV, Cavada BS, Barral-Netto M. Lectin induced nitric oxide production. *Cellular Immunology* 1999; 194: 98-102.

- [30] Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangeiro TB, Freitas LAR, Barral-Netto M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001; 96: 673-678.
- [31] Cavada B.S, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro T.B, Barral-Netto M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of Diocleinae Subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Science* 2001; 2: 123-135.
- [32] Pelletier M, Lavastre V, Savoie A, Ratthé C, Saller R, Hostanska K. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. *Clinical Immunology* 2001; 101: 229-236.
- [33] Alencar NMN, Assreuy AMS, Alencar VBM, Melo SC, Ramos MV, Cavada BS, Cunha FQ, Ribeiro R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macroparca* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003; 35: 1674-1681.
- [34] Alencar NMN, Assreuy AMS, Criddle DN, Souza EP, Soares PMG, Havt AT, Aragão KS, Bezerra DP, Ribeiro RA, Cavada BS. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. *Protein and Peptide Letters* 2004; 11: 195-200.
- [35] Alencar VBM, Alencar MNN, Assreuy AMS, Mota ML, Brito GA C, Aragão KS, Bittencourt FS, Pinto VPT, Debray M, Ribeiro RA, Cavada BS. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37:1805-1814.
- [36] Barauna SC, Kaster MP, Heckert BT, Nascimento KS, Rossi FM, Teixeira EH, Cavada BS, Rodrigues AL, Leal RB. Antidepressant-like effect of from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Biochemistry and Behavior* 2006; 85: 160-169.
- [37] Park JEP, Barbul AB. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery* 2004; 187: 115-165.
- [38] Lomba M, Lomba A. *Resgate Saúde – Medicina pré-hospitalar*. Olinda: Grupo Universo; 2000.
- [39] Robbins SL, Cotran RS. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7 rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- [40] Assreuy AM, Alencar NMN, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RFG, Cunha QF, Calvete JJ, Ribeiro RA. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates

macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 1836-1841.

[41] Cavada BS, Ramos MV, Cordeiro EF, Grangeiro TB, Oliveira JTA, Carvalho AFFV, Moreira RA. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 1996; 1:37-42.

[42] Maciel EVM, Araujo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes Y M, Coelho LCBB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 2004; 32: 57-60.

[43] Pastor MI, Reif K, Cantrell D. The regulation and function of p21^{ras} during T-cell activation and growth. *Immunol Today* 1995; 16: 159-64.

[44] Dubois B, Peumans WJ, Van Damme EJM, Van Damme JV, Opdenakker G. Regulation of galatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. *FEBS Letters* 1998; 427: 275-278.

[45] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and Function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 2006; 69: 562-573.

[46] Sell AM, Costa CP. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2003; 46.

[47] Sharon N, Lis H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal* 1990; 4: 3198-3208.

[48] Grangeiro TB, Schrieffer A, Calvete JJ, Raida M, Urbanke C, Barral-Netto M, Cavada BS. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia braziliensis* seeds. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1997; 248: 43-48.

[49] Calvete JJ, Thole HH, Raida M, Urbanke C, Romero A, Grangeiro TB, Ramos MV, Rocha IMA, Guimarães FN, Cavada BS. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1430: 367-375.

[50] Carvalho, H. F. Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. *Ciência e Cultura* 1990; 42: 884-893.

LIST OF CAPTIONS

Figure 1. Percent of clinic signals, average of wound area (cm²) and time in days after the treatment topic with lectin from *Eugenia malaccensis* (A) and NaCl 150 mM (B).

Figure 2. Percent of clinic signals and time in days after the treatment topic with lectin from *Eugenia malaccensis* (A) and NaCl 150 mM (B).

Figure 3. Macroscopic aspects of the experimental wound. Day of surgery: **A**, group EmaL and **E**, NaCl 150mM; Second day after surgery (AS): **B**, group EmaL and **F**, NaCl 150mM; Seven day AS: **C**, group EmaL and **G**, NaCl 150mM, Twelve days AS: **D**, group EmaL and **H**, NaCl 150mM.

Figure 4. Histopathological aspects of the cutaneous wounds, Trichromic of Masson (100X). 2th day after surgery: **A**, NaCl 150 mM and **B**, EmaL; 7th day after surgery: **C**, NaCl 150 mM and **D**, EmaL and 12th day after surgery: **E**, NaCl 150 mM and **F**, EmaL. c- crust; i- infiltrated inflammatory; at- area of transition; a- angiogenesis; → fibroblast; * collagenous fibers; v- vascular granulation tissue; r- reepithelialization; fv- fibrovascular granulation tissue; ep- epidermis; f- fibrous granulation tissue.

Figure 1

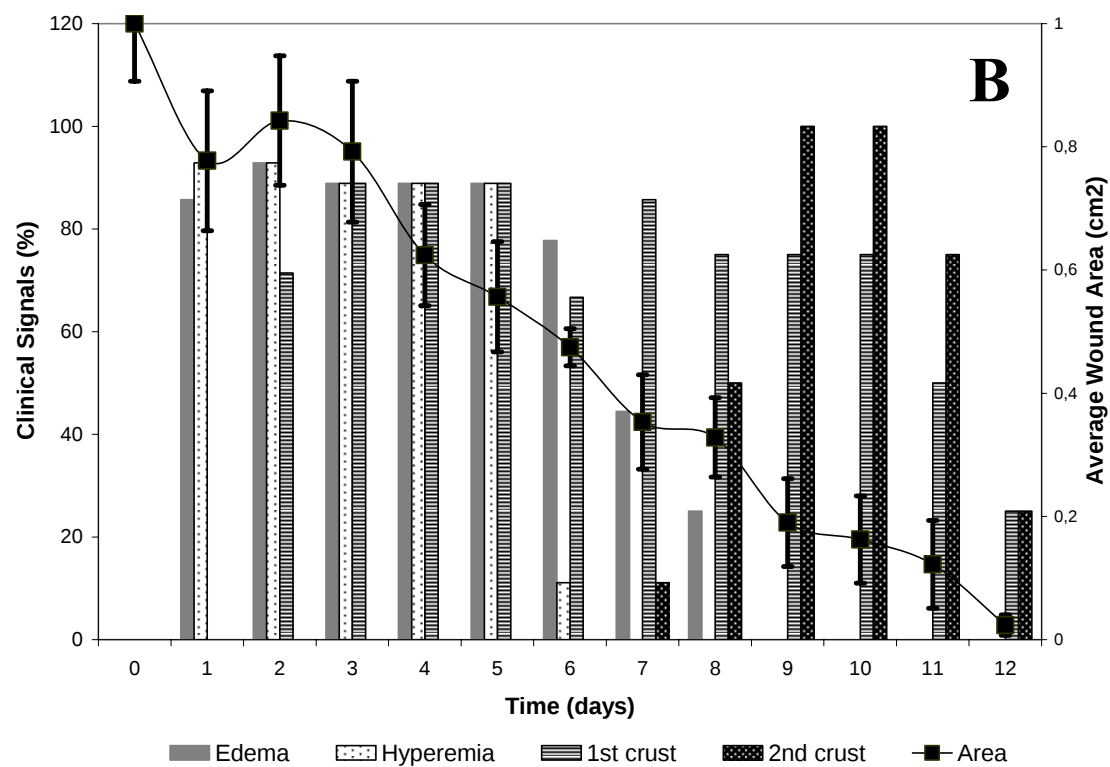
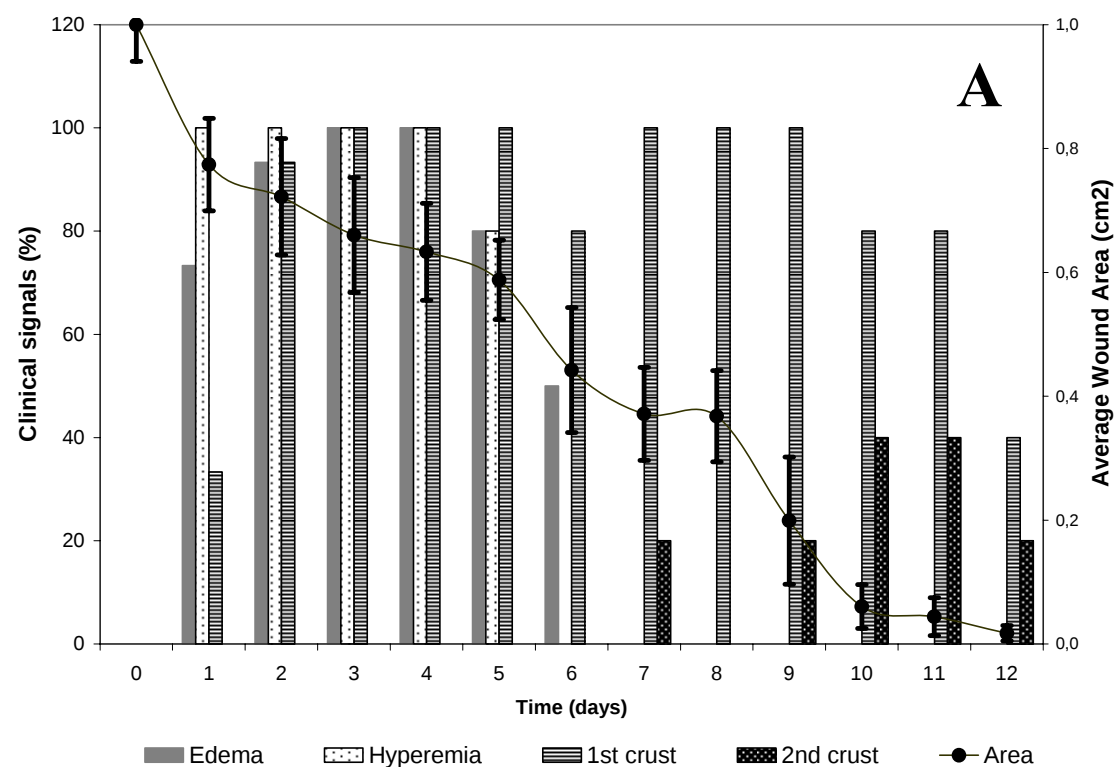


Figure 2

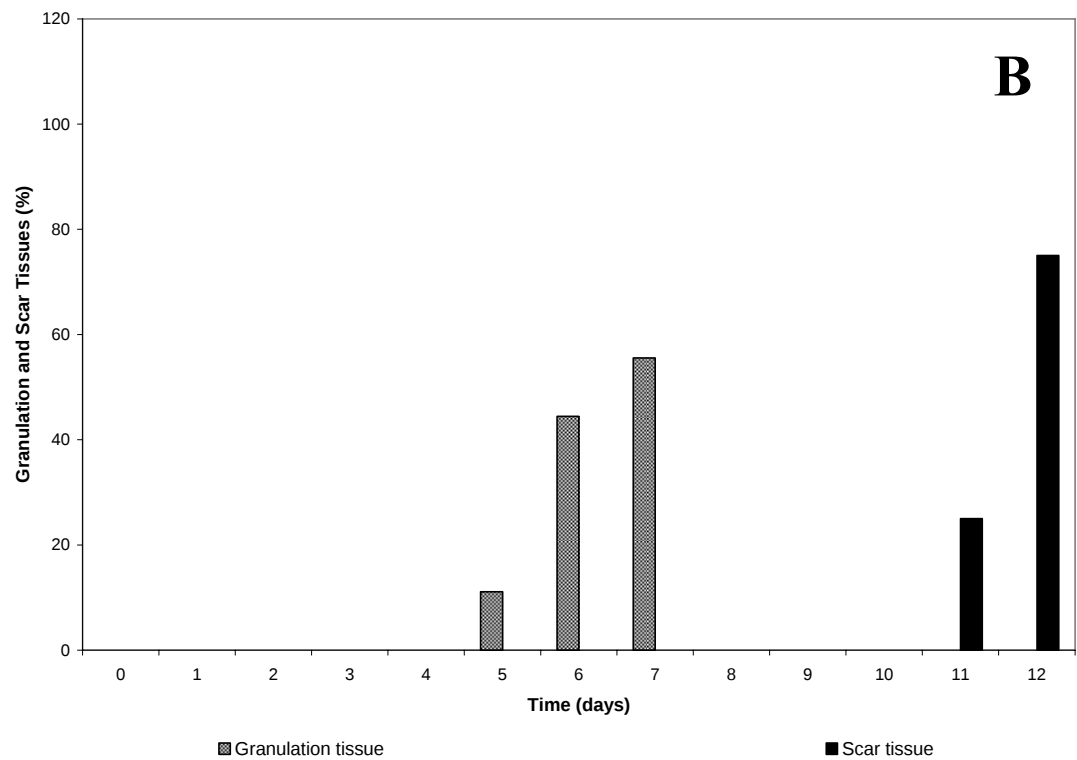
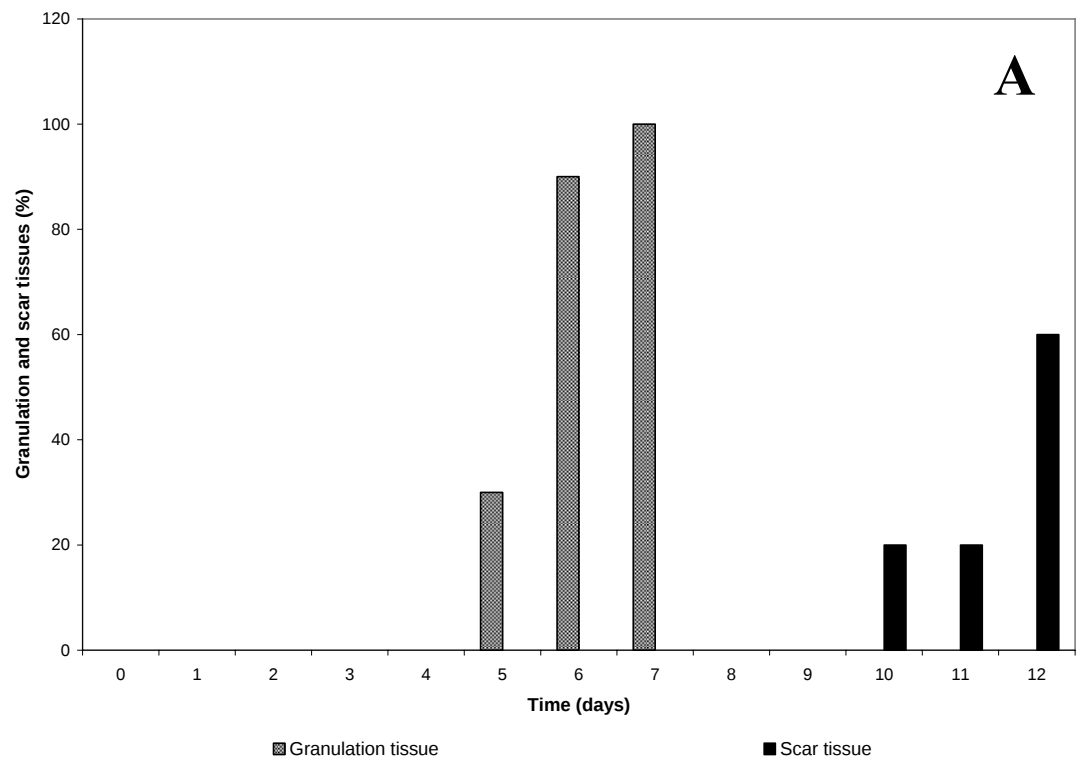


Figure 3

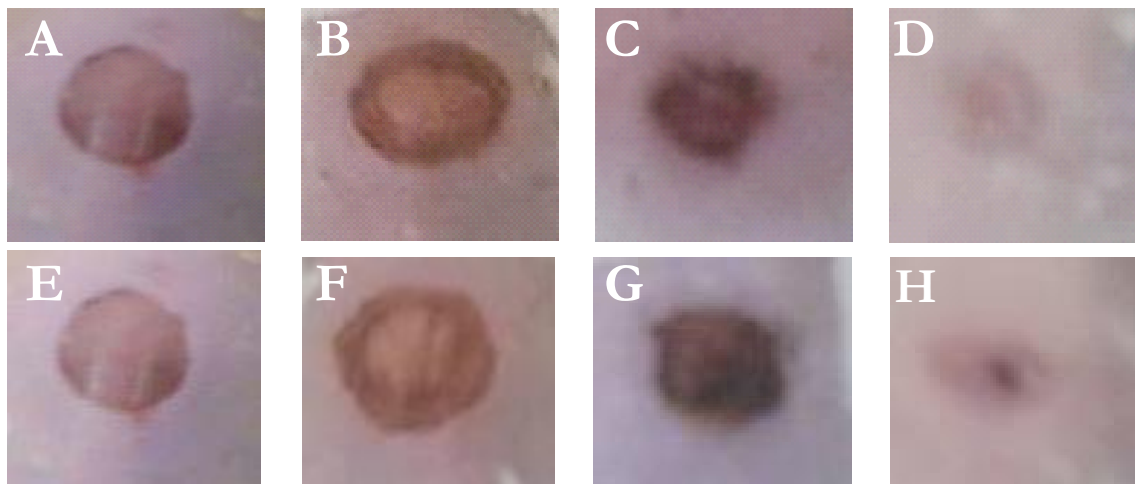
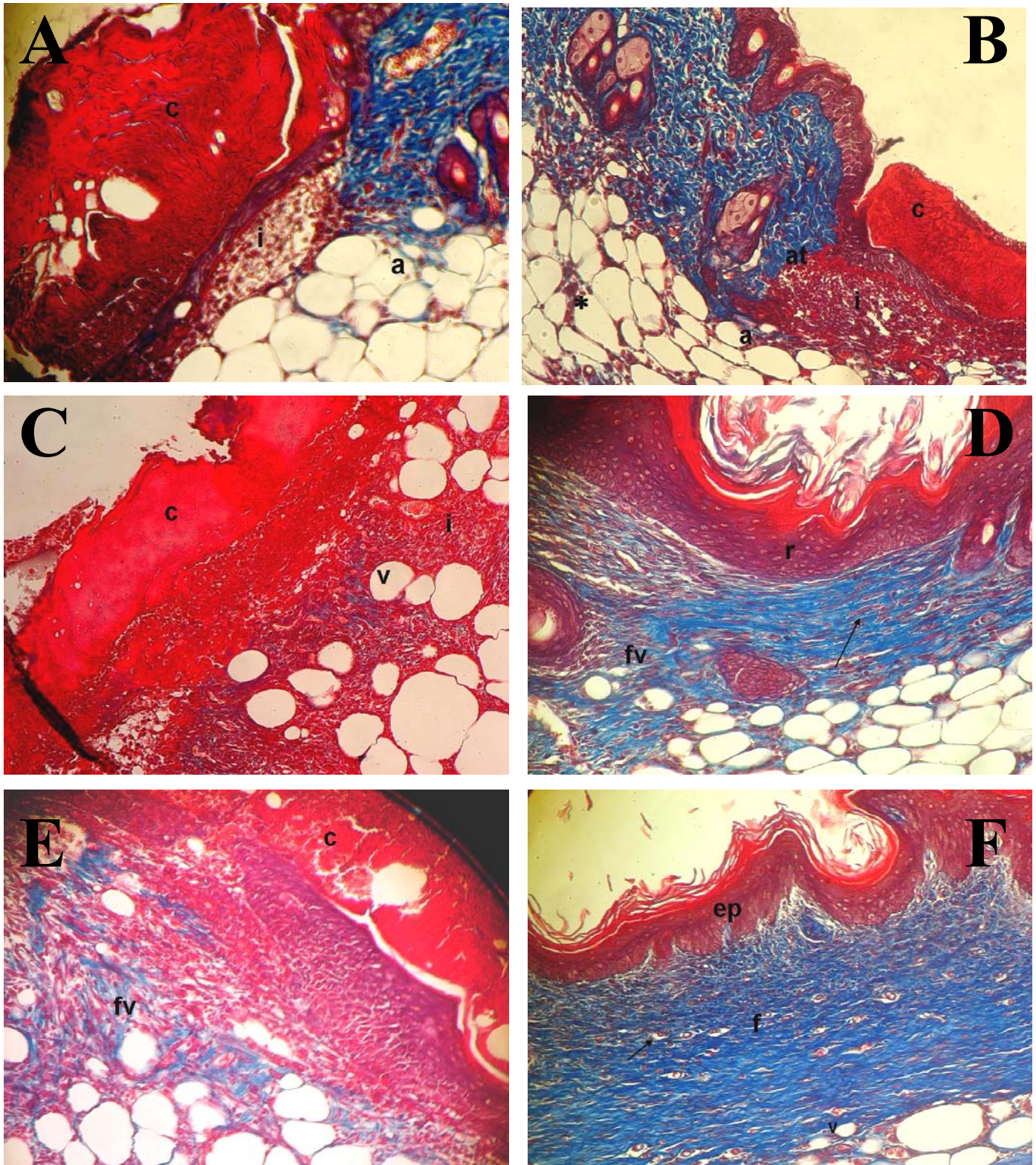


Figure 4



CONCLUSÕES

- Os sinais inflamatórios iniciais e de reparo das lesões mostraram-se menos intensos e permaneceram por menor tempo no grupo tratado com a EmaL.
- A diminuição da área da lesão ocorreu de forma similar para ambos os grupos.
- A análise microbiológica das lesões apresentaram *Staphylococcus* sp., microrganismo que faz parte da microbiota normal da pele.
- No que diz respeito aos aspectos histopatológicos, ocorreram pequenas diferenças entre o grupo tratado com a EmaL e o controle, evidenciando-se a presença de um tecido de granulação fibroso no grupo tratado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O conjunto de resultados obtidos sugere que a lectina de *Eugenia malaccensis* apresenta uma evidência farmacológica preliminar como um provável biomaterial frente ao processo cicatricial. Futuras avaliações da lesão poderão esclarecer melhor o efeito dessa lectina frente a cicatrização cutânea experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macroparca* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; HAVT, A.T.; ARAGÃO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, V. B. M.; ALENCAR, M. N. N.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A. C.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P. T.; DEBRAY, M.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ANURADHA, P.; BHIDE, S. V. An isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. **Phytochemistry**, v. 52, p. 751-758, 1999.

ARBISER, J. L. Angiogenesis and the skin: a primer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, p. 486-497, 1996.

ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 92, p. 12-18, 2002.

ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.G.; CUNHA, Q.F.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1836-1841, 2003.

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125 - 134, 2004.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

BATTERBURY, M.; TEBBS, C. A.; RHODES, J. M. AND GRIERSON, I. *Agaricus bisporus* (Edible Mushrooms lectin) inhibits ocular fibroblast proliferation and collagen lattice contraction. **Exp. Eye Res.** v. 74, p. 361 - 370, 2002.

BENTO, C. A. S. **Estudo da interface Ti-6 Al – 4V/ TiO₂ por microscopia eletrônica de varredura**, 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BERGSTON, N.; ALLMAN, R. M.; ALVAREZ, O. M.; BENNETT, C. E.; CARLSON, C. E.; FRANTZ, R. A.; GARBER, S. L.; GOSNELI, D.; JACKSON, B. S.; KAMINSKI, M. V.; KEMP, M. G.; KROSKOP, T. A.; LEWIS, V. L.; MAKLEBUST, J.; MARGOLIS, D. L.; MARVEL, R. M.; REGER, S. I.; RODEHEAVER, G. T.; SALCIDO, R.; XAKELLIS, G. C.; YARKONY, G. M.. Pressure ulcer treatment: quick reference guide for clinicians. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 22-44, 1995.

BIKOWSKI, J. Antimicrobial wound management in the emergency department: an educational supplement. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n.1, p. 197- 206, 1999.

BRANSKI, R. C.; ROSEN, C. A.; VERDOLINE, K.; HEBDA, P. A. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

BRUSTEIN, V. P.; COELHO, L. C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PAIVA, P. M. G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. S. Purification and characterization of *Eugenia malaccensis* seed lectin with antimicrobial activity. **Biologicals** (In Review), 2006.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds**, v. 10, n.1, p. 12-32, 1998.

CAMPELO, C. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais no estado de Alagoas. **Acta-Amazonica-suplemento**, v. 18, p. 305 – 312, 1988.

CARVALHO, H. F. Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. **Ciência e Cultura**, v. 42, p. 884-893, 1990.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARVALHO, F.; HAZIN, F. H. V.; PIERCY, A.; BURGESS, G. Population structure and utilization of habitat by *Dasyatis amaricana* (Bigelow e Schroeder 1953) at the Atol das Rocas Biological Reserve, Brazil. **Bulletin of Marine Science**, v. 71, p. 53-79, 2006.

CAVADA, B.S.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; GRANGEIRO, T.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.F.V.; MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 1, p. 37-42, 1996.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

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

CLARK, R. A. F. Fibrin and wound healing. **Ann New York Acad Sci**, v. 936, p. 355-367, 2001.

CLARK, L. D.; CLARK, R. K.; HEBER-KATZ, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 88, n.1, p. 35-45, 1998.

COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-6, 2000.

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

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 283-289, 2004.

DIPIETRO, L.; BURNS, A. L. **Wound healing: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 38-46.

DUBOIS, B.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; VAN DAMME, J. V.; OPDENAKKER, G. Regulation of galatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. **FEBS Letters**, v. 427, p. 275-278, 1998.

FREIRE, M. G.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONI, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GAIDAMASHVILI, M.; STANDEN J. V. Interactin of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 131 - 135, 2002.

GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEM Microbiology Letters**, v. 10579, p. 61-68, 2002.

GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices of dermal wound healing process in rat. **Biomaterials**, v. 24, p. 2767-2772, 2003.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia braziliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 248, p. 43-48, 1997.

HALL, L.W., CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**. London: Ballière Tindall, 1991, 410p, 9. ed.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 752, p. 207-216, 2001.

INNGJERDINGER, K.; NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; MOUNKORO, P. P. PAULSEN, B. S. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 233-244, 2004.

ISIDRO, R.; SALES, F.J.M.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; MOREIRA, R.A. Ação de lectinas de sementes de canavalia brasiliensis mart. sob comportamento da saúva do nordeste (*Atta opaciceos* Borgmeier, 1939). **Rev. Fac. Agron**, v. 25, p.77-86. 2001.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 125 (B), p. 227-236, 2000.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**. v. 10, n. 1, p. 1-25, 1990.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777p.

KAHARI, V. M.; SAARIALHO-KERE, V. Matrix metalloproteinases in skin. Experimental. **Dermatology**, v. 6, p. 199-213, 1997.

KARASAKI, Y. TSUKAMOTO; S. MIZUSAKI; K. SUGIURA; T. GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research international**, v.34, p. 7 - 13, 2001.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition- a review. **Carbohydrate Polymer**. v. 26, p. 219-230. 1995

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11, p. 55-65, 1999.

KUROKAWA, I.; MIZUTANI, H.; KUSUMOTO, K.; NISHIJIMA, S.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; SHIKATA, N.; TSUBURA, A. Cytokeratin, filaggrin, and p63 expression in reepithelization during human cutaneous wound healing. **Wound healing and Regeneratio**, v. 14, p. 38-45, 2006.

LAURENS, N.; KOOLWIJK, P.; DE MAAT, M. P. M. Fibrin structure and wound healing. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, p. 932-939, 2006.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-32. 1995.

LOMBA, M.; LOMBA, A. **Resgate Saúde – Medicina pré-hospitalar**. Olinda: Grupo Universo, 2000. p. 65-86. 2000.

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

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

MACIEL, E. V. M.; ARAUJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 74-81, 1997.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, Jr C. Innate immunity. **N Engl J Med**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MELO, et al (2003) apoud PORTO, C. S.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais**. IN: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRPE, v. 1. p. 133. 2006.

- MITCHELL, M. S. Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 80, p. 1445-1450, 1988.
- MOORE, K. Cell biology of chronic wounds: the role of inflammation. **J Wound Care**, v. 8, n. 7, p. 345-348, 1999.
- MOREIRA, R. A., SOUSA-CAVADA, B., OLIVEIRA, J. T. A., AINOUEZ, I. L. **Plants lectins in: Proceeding of the First Brazilian Congress on Proteins.** (Oliveira, B. e Sgabieri, S.; ed). Unicamp, Campinas, 1991. p. 71-96
- MORISON, M.; MOFFATT, C.; BRIDEL-NIXON, J.; BALE, S. **A colour guide to the nursing management of chronic wounds.** London: Mosby, 1997. p. 298. 2. ed.
- MORTON, J. Malay Apple. **In: Fruits of warm climates.** Julia F. Morton, Miami, FL, p. 378 – 381, 1987.
- MOULIN, V.; AUGER, F. A.; GARREL, D.; GERMAIN, L. Role of wound repair myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. **Burns**, v. 26, p. 3-12, 2000.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and Function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006.
- NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, p. 379-390, 2005.
- NICOLSON, G. L.; BLAUSTEIN, J. The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surface. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 266, p. 543-547, 1972.
- OTTINGER, C.A., JOHNSON, S.C., EWART, K.V., BROWN, L.L., ROSS, N.W. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo solar*) macrophages by a mannose-binding lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology** Part C, v. 123, p. 53-59, 1999.
- PARK, J. E. P.; BARBUL, A. B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 115-165, 2004.
- PASTOR, M. I.; REIF, K.; CANTRELL, D. The regulation and function of p21^{ras} during T-cell activation and growth. **Immunol Today**, v. 16, p. 159-64, 1995.
- PELLETIER, M.; LAVASTRE, V.; SAVOIE, A.; RATTHÉ, C.; SALLER, R.; HOSTANSKA, K. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. **Clinical Immunology**, v. 101, p. 229-236, 2001.
- PORTO, C. S.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais.** IN: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRRPE, v. 1. p. 133. 2006.

PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v..3, n.2, p. 43-48. 1988.

PRIYA, K. S.; ARUMUGAM, G.; RATHINAM, B.; WELLS, A.; BABU, M. Celosia argentea Linn. Leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. **Wound Rep Reg**, v. 12, p. 618-625, 2004.

RAMSEY, D. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American. Journal. Veterinary. Research**, v. 56, n.7, p. 941-949, 1995.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHALAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739 – 744, 2001.

REGAN, M. C.; BARBUL, A. **The cellular biology of wound healing**. In: SCHALAG, G.; REDL, H. (Eds.). Fibrin sealing in surgical and nonsurgical fields. Heidelberg: Springer, p. 3-17, 1994.

RIBEIRO, J. E. L. S. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 800p. 1999.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.112-123. 7. ed.

RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists. **Acta Anatômica**, v.161, p.130-152, 1998.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LEITH, C. W.; DIAZ-MARINO, T.; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389 - 416, 2000.

SACCHETTINI, J. C.; BREWER, C. F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 40, p. 3009-3015, 2001.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, p. 274-286, 2005.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Party B 125, p. 169-177, 2000.

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, U.; BARBUL, A. Wound fluid inhibits wound fibroblast nitric oxide synthesis. **Journal of Surgical Research**, v. 122, p. 43-48, 2004.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, 2003.

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

SCHIRATO, et al (2006) apoud PORTO, C. S.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais**. IN: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRPE, v. 1. p. 133. 2006.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: WU, A. M. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**, p. 1-16, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Heildelberg: Springer, 470 p. 2004. 2. ed.

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

SILVA, I. G. Correção de Cicatrizes. In: MEGELA, I M. **Cirurgia plástica reparadora e estética**, São Paulo: Medsi, 2000.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p.738-746, 1999.

SINGER, A. J.; MCCLAIN, A. Persistent wound infection delays epidermal maturation and increases scarring in thermal burns. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, p. 372-377, 2002.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. A. M.; KENNEDY, J. F.; LIMA, J. L.; COELHO, L. C. B. B. A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metalic surface. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 191-193, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005, 640 p.

SPECTOR, M. **Biomaterials**. In: Plastic Surgery, Indications, Operations, Outcomes. Achauer, B.; Eriksson, E.; Guyuron, B. Mosby Year Book, p. 239-259, 2001.

STEED, O. L. Papel dos fatores de crescimento na cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. v. 3, Rio de Janeiro: Interlivros. p. 571-582, 1997.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. São Paulo: Manole, 1996. p. 72.

SWAIM, S. F.; HENDERSON, Jr. R. A. **Small animal wound management**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p. 53-85. Cap. 3. 2. ed.

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe?. **Surgery**, v. 137, p. 571-573, 2005.

TALAS-OGRA, T.; IPEKCI, Z.; BAJROVIC, K.; GOZUKIRMIZI, N. Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 67-72, 2005.

TASUMI, S.; YANG, W.-J.; USAMI, T.; TSUTSUI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; WILDER, M. N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y. Characteristics and primary structure of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental Comparative Immunology**, v. 28, p. 325 - 335, 2004.

THOMAS, D. W.; O'NEILL, I. D.; HARDING, K. G.; SHEPHERD, J. P. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, p. 442-447, 1995.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: Immunological aspects. **Injury**, v. 37, p. 5-12, 2006.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523-536, 1997.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835-870, 2003.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183-187, 1998.

WONG, T. T. L.; SETHI, C.; DANIELS, J. T.; LIMB, G. A.; MURPHY, G.; KHAW, P. T. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. **Survey of Ophthalmology**, v. 47, n. 3, 2002.

WOODLEY, J. Bioadhesion: New possibilities for drug administration?. **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p.77 - 84, 2001.

WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilii*. **Life Science**, v. 66, p. 2571 – 2581, 2001.