MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

FÁBIO DE OLIVEIRA SILVA RIBEIRO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL TOXICOLÓGICO DAS GOMAS DO SERIGUELEIRO (*Spondias purpurea*) e LIMOEIRO (*Citrus* × *latifolia)* COMO FONTE PARA PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

BRASÍLIA

2025

FÁBIO DE OLIVEIRA SILVA RIBEIRO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL TOXICOLÓGICO DAS GOMAS DO SERIGUELEIRO (*Spondias purpurea*) e LIMOEIRO (*Citrus* × *latifolia)* COMO FONTE PARA PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Tese de doutorado apresentado ao Programa Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília - UnB, como parte dos requisitos necessários para obtenção de título de doutor em Ciências Médicas.

Aréa de Ciências Aplicadas em Saúde

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto de Souza Almeida Leite

COORIENTADORA: Profª. Drª. Durcilene Alves da Silva

BRASÍLIA

2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Oliveira Silva Ribeiro, Fábio
di ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL TOXICOLÓGICO DAS GOMAS DO SERIGUELEIRO (Spondias purpurea) e LIMOEIRO (Citrus x latifolia) COMO FONTE PARA PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS / Fábio de Oliveira Silva Ribeiro; orientador José Roberto de Souza Almeida Leite; co-orientador Durcilene Alves da Silva. -- Brasília, 2025.
100 p.

Tese(Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2025.

1. Arabinogalactanas. 2. Caracterização química. 3. Perfil toxicológico. I. Roberto de Souza Almeida Leite, José, orient. II. Alves da Silva, Durcilene, co-orient. III. Título.

FÁBIO DE OLIVEIRA SILVA RIBEIRO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL TOXICOLÓGICO DAS GOMAS DO SERIGUELEIRO (*Spodias purpurea*) e LIMOEIRO (*Citrus* × *latifolia)* COMO FONTE PARA PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Roberto de Souza Almeida Leite
Presidente/Orientador

Profª. Drª. Durcilene Alves da Silva
Coorientadora

Dra. Antônia Carla de Jesus Oliveira
Examinador (a)

Dra. Débora Andreia Campelo Campos
Examinador (a)

Dr. Guilherme Dotto Brand
Examinador

Agradecimento

Agradeço fortemente a minha base, minha família, mamãe (Maria Antônia, que lutou para que os filhos conseguissem ter acesso a educação que não pôde ter), avós (Maria Augusta e Antônio Luiz, meus anjos), irmãs (Patricia e Fabricia), sobrinhas (Ana Clara e Aurora) e sobrinho (Guilherme), cunhados e padrinhos por todo o apoio e acreditarem no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A meu orientador Prof. Dr. José Roberto de Souza Almeida Leite e coorientadora Profª Drª Durcilene Alves da Silva, pela imensa contribuição e paciência. Lhes agradeço imensamente pela confiança depositada em mim. Um elo que une o Universidade de Brasília à Universidade Federal do Delta do Parnaíba. A incansável busca por recursos para a desenvolvimento de projetos e alunos, fundação de núcleos de pesquisas aplicados, formação de recursos humanos especializados, estão entre os esforços que os engrandecem aos olhos de seus orientandos e meus. Grato por ser oreintado pelos cientistas que estão entre os mais influêntes no mundo da pesquisa.

Agradeço aos amigos (Alyne, Gisele, Mariana e Raí), conselheiros, psicólogos e inimigos da mobralidade que sempre estão comigo em todos os momentos da minha vida. Todos de alguma forma tornaram possivel a escrita desse trabalho e do almeijado título.

Agradeço aos membros do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC) e ao Centro de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) pelos dias de convivência, risos e desafios que enfrentamos juntos para o desenvolvimento da pesquisa no Brasil e mundo.

Agradeço imensamente todos os colaboradores e laboratórios parceiros que me ajudaram a engrandecer muito os meus trabalhos. Meus agradecimentos LabPol - UFC, LAGO – UFPI, LOE - UFC, LIGAT – UFDPAR e UFPB!

“A ciência é apenas uma ferramenta para ajudar o homem a viver melhor e transformar o mundo”.

SUMÁRIO

RESUMO 12
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 14
2 REFERENCIAL TEÓRICO 15
2.1 Flora do Brasil 15
2.2 Gênero *Citrus* 16
2.3 Gênero Spondias 17
2.4 Polissacarídeos 18
2.5 Gomas 19
REFERÊNCIAS 19
3 OBJETIVOS 26
3.1 OBJETIVO GERAL 26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26
CAPÍTULO 1 27
RESUMO 28
ABSTRACT 29
1. INTRODUÇÃO 30
2 METODOLOGIA 31
2.1 Isolamento da GL 31
2.2 Cromatografia de exclusão de massa 31
2.3 Análise elementar, termogravimétrica e potencial Zeta 31
2.4 Hidrólise e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 32
2. 5 Ressonância magnética nuclear (RMN) 32
2.6 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* 32
2.7 Teste de toxicidade *in vivo* 33
2.7.1 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella* 33
2.7.2 Teste para determinação de toxicidade aguda em camundongos 33
2.7.3 Análise estatística 34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
3.1 Caracterização do GL 35
3.3 Teste de toxicidade *in vivo* 44
3.3.1 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella* 44
3.3.2 Avaliação da Triagem Hipocrática 44

3.3.3 Análise da massa corporal dos animais após o período de tratamento e da massa média dos órgãos 47
3.3.4 Avaliação da ingestão de alimentos e água, excreção e aparência fecal 47
3.3.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e do plasma 48
3.3.5 Avaliação histológica dos órgãos 50
4. CONCLUSÃO 52
REFERÊNCIAS 52
CAPÍTULO 2 61
RESUMO 62
ABSTRACT 63
1. INTRODUÇÃO 64
2. METODOLOGIA 65
2.1 Isolamento da GS 65
2.2 Caracterização da GS 65
2.2.1 Hidrólise e cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG-MS) 65
2.2.2 Cromatografia de exclusão de massa (SEC) 66
2.2.3 Viscosidade 66
2.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) 66
2.2.5 Análise elementar 66
2.2.6 Potencial Zeta (ζ) 66
2.2.7 Ácidos urônicos 67
2.2.8 Análise térmica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) 67
2.2.9 Difração de raios X 67
2.2.10 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) 67
2.3 Testes de toxicidade *in vitro* 67
2.3.1 Hemólise 67
2.3.2 Citotoxicidade 68
2.4 Testes de toxicidade *in vivo* 68
2.4.1 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella* 68
2.4.2 Teste para determinação de toxicidade aguda em camundongos 69
2.5 Análise estatística 69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 70
3.1 Isolamento e composição de GS 70
3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) 73
3.3 Ácidos urônicos 74
3.4 Massa molar 74

3.5 RMN 75
3.6 Viscosidade 79
3.7 Análise térmica e XDR 80
3.8 Hemólise 82
3.9 Teste de citotoxicidade 82
3.10 Toxicidade em *G. mellonella* 83
3.11 Toxicidade aguda em camundongos 84
CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 91
ANEXO CAPITULO 2 99

LISTA DE FIGURAS

Capitulo 1

Figura 1. Espécime de *C.* × *latifolia* no ambiente, da coleta ao polissacarídeo..... 35

Figura 2. Cromatograma da distribuição da massa molar da..... 36

Figura 3. Termograma por análise termogravimétrica (TGA) de 37

Figura 4. Espectros de RMN 1D da GL em D_2O..... 38

Figura 5. Espectro de RMN de HSQC de $^{1}H/^{13}C$ da GL em D_2O..... 39

Figura 6. Padrão estrutural da GL obtido por análise estrutural..... 40

Figura 7. Inibição da proliferação celular (%) de GL em diferentes..... 42

Figura 8. Análise morfológica da linhagem celular PC-3 43

Figura 9. Curva de sobrevivência da toxicidade de GL em..... 44

Figura 10. Histopatologia do Baço: A) grupo salina e (B) grupo GL..... 51

Capitulo 2

Figura 1. Esquema para obtenção da GS..... 71

Figura 2. Espectro infravermelho da GS..... 73

Figura 3. Cromatograma de distribuição de massa molar..... 75

Figura 4. Espectros de RMN 1D da GS em D_2O..... 76

Figura 5. Espectro de RMN de HSQC de $^{1}H/^{13}C$ da GS em D_2O..... 78

Figura 6. Padrão estrutural da GS obtido por análise estrutural..... 79

Figura 7. Curva de viscosidade (A) e curva de fluxo (B) da GS..... 80

Figura 8. Curva termogravimétrica e curva derivada (A) e DSC (B) da GS..... 80

Figura 9. Difratograma da GS..... 81

Figura 10. Gráfico do perfil hemolítico da GS..... 82

Figura 11. Gráfico de citotóxicidade em células tumorais e não tumorais..... 83

Figura 12. Gráfico de toxicidade *in vivo* em *G. mellonella*..... 84

Figura 13. Histopatologia de órgãos vitais no processo de toxicidade..... 88

Figura 14. Gráficos da avaliação histomorfométrica dos orgãos..... 89

LISTA DE TABELAS

Capitulo 1

Tabela 1. Composição monossacarídca da GL..... 41
Tabela 2. Triagem hipocrática..... 46
Tabela 3. Ação da GL no ganho de massa corporal (g) e na massa..... 47
Tabela 4. Médias dos valores obtidos no consumo de água e ração, produção..... 48
Tabela 5. Análises hematológicas e bioquímicas..... 49

Capitulo 2

Tabela 1. Caracterização a GS..... 72
Tabela 2. Deslocamento químico de RMN de ^{13}C para GS..... 77
Tabela 3. Análise dos hábitos fisiológicos diários de camundongos..... 85
Tabela 4. Análise do peso corporal e peso relativo dos órgãos..... 86
Tabela 5. Análises hematológicas e bioquímicas..... 87

RESUMO

Tendo em vista a diversidade florística nativa brasileira, o investimento no desenvolvimento biotecnológico de produtos naturais é necessário. Polissacarídeos são carboidratos complexos que desempenham papéis diversos em sistemas biológicos e aplicações industriais. As diferentes fontes de obtenção dos polissacarídeos refletem nas diversas propriedades químicas e físico-químicas que os mesmos possuem. Com base nisso, o objetivo desde trabalho é estudar as propriedades fisico-quimicas, estruturais e biológicas de polissacarídeos extraídos de exsudatos *Citrus* × *latifolia* (limoeiro) e *Spondias purpurea* (serigueleiro). Para tanto, o primeiro cápitulo, a goma de limoeiro (GL) foi isolada e caracterizada. Além disso, a biocompatibilidade da goma foi avaliada *in vitro* (células não tumorais e tumorais) e *in vivo* (*Galleria mellonella* e modelo de toxicidade aguda em camundongos). A proporção entre os monossacarídeos encontrados na GL foi 1:0,65:0,06:0,15 para arabinose:galactose:ramnose:4-OMe-ácido glucurônico. Pequenos traços de proteína foram detectados, enfatizando a pureza do isolado. A GL apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer de adenocarcinoma de próstata humano e nos modelos de toxicidade *in vivo* demonstraram que a GL é um polímero biocompatível. No segundo cápitulo, após o isolamento da goma do serigueleiro (GS), sua composição foi determinada e seu perfil estrutural avaliado. Além de propriedades físico-químicas, térmicas e toxicidade foi observada *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que a razão de monossacarídeos estabelecida foi de 1:0,55:0,05:0,04:0,03 para Gal:Ara:Gli:Man:Xil, respectivamente, indicando a presença de uma arabinogalactana de alta massa molar, com pequenos traços de proteína e 16% de ácidos urônicos, bem como a ocorrência de ácidos glucurônico e 4-O-metil glucurônico evidenciados. Possui 3 eventos de degradação térmica. Os resultados de toxicidade *in vitro* e *in vivo* demonstraram a biocompatibilidade de GS nos modelos testados. Portanto, nossos achados destacam o uso potencial da GL e GS em diferentes abordagens biotecnológicas, devido às suas características físico-químicas e perfis atóxicos.

PALAVRAS-CHAVE: Arabinogalactanas; Caracterização química; Perfil toxicológico.

ABSTRACT

Considering the native Brazilian floral diversity, investment in the biotechnological development of natural products is necessary. Polysaccharides are complex carbohydrates that play diverse roles in biological systems and industrial applications. The different sources of polysaccharides reflect the diverse chemical and physicochemical properties that they possess. Based on this, the objective of this work is to study the physicochemical, structural and biological properties of polysaccharides extracted from exudates of *Citrus* × *latifolia* (lemon tree) and *Spondias purpurea* (serigueleiro). For this purpose, in the first chapter, lemon tree gum (LG) was isolated and characterized. In addition, the biocompatibility of the gum was evaluated *in vitro* (non-tumor and tumor cells) and in vivo (*Galleria mellonella* and acute toxicity model in mice). The ratio of monosaccharides found in LG was 1:0.65:0.06:0.15 for arabinose:galactose:rhamnose:4-OMe-glucuronic acid. Small traces of protein were detected, emphasizing the purity of the isolate. LG showed antiproliferative activity against human prostate adenocarcinoma cells and *in vivo* toxicity models demonstrated that LG is a biocompatible polymer. In the second chapter, after isolation of seriguela tree gum (SG), its composition was determined and its structural profile was evaluated. In addition, physicochemical and thermal properties and toxicity were observed *in vitro* and *in vivo*. The results demonstrated that the established monosaccharide ratio was 1:0.55:0.05:0.04:0.03 for Gal:Ara:Gly:Man:Xyl, respectively, indicating the presence of a high molar mass arabinogalactan, with small traces of protein and 16% uronic acids, as well as the occurrence of glucuronic and 4-O-methyl glucuronic acids evidenced. It has 3 thermal degradation events. The *in vitro* and *in vivo* toxicity results demonstrated the biocompatibility of SG in the tested models. Therefore, due to their physicochemical characteristics and non-toxic profiles, our findings highlight the potential use of LG and SG in different biotechnological approaches.

KEYWORDS: Arabinogalactans; Chemical characterization; Toxicological profile.

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são carboidratos complexos que desempenham papéis diversos em sistemas biológicos e aplicações industriais (Saraswat *et al*., 2023). Eles servem como componentes estruturais em plantas, reservas de energia e materiais funcionais em vários campos, incluindo ciência de alimentos e medicina. Suas propriedades únicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, os tornam valiosos no desenvolvimento de materiais inovadores e agentes terapêuticos (Elango *et al*., 2023; Benalaya *et al*., 2024; Sharma; Bhende, 2024).

Os polissacarídeos são geralmente derivados de plantas, fungos e outros recursos biológicos naturais (Darge *et al*., 2019; Benalaya *et al*., 2024). Esses polissacarídeos naturais não são apenas componentes funcionais da planta, fornecendo energia e nutrientes para o consumo humano. Mas também desempenham papéis importantes em processos biológicos celulares, atuando como substâncias fisiologicamente ativas e desempenhando funções reguladoras biológicas (Caffall; Mohnen, 2009; Piršelová; Matušíková, 2013; Benalaya *et al*., 2024). Nos últimos anos, a pesquisa envolvendo os polissacarídeos naturais têm atraído cada vez mais atenção, devido à versatilidade desses biomateriais e seu amplo espectro de aplicação (Elango *et al*., 2023; Ramaprabha *et al*., 2024).

As diferentes fontes de obtenção dos polissacarídeos refletem nas diversas propriedades químicas e físico-químicas que os mesmos possuem (Mohammed; Naveed; Jost, 2021). Eles podem diferir em termos de grau de polimerização (Saavedra-Leos *et al*., 2015) peso molecular (Wang *et al*., 2023), composição de monossacarídeos (HU et al., 2021), estrutura molecular, tipo de ligação glicosídica, arranjo e estrutura de ramificação, bem como em termos de grupos reativos e outras propriedades (Du; Jeepipalli; Xu, 2022; Chen; Zhang; Chen, 2024).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Flora do Brasil

O Brasil apresenta uma diversidade biológica única no mundo, com mais 20 % da biodiversidade mundial. A flora brasileira apresenta cerca de 49 mil espécies descritas (IBGE, 2020). A importância da biodiversidade vai além da ambiental e reflete nas questões sociais e na geração de renda para povos e comunidades (Conab, 2017). A região do Nordeste do Brasil abriga cerca de 54 % e 27% do bioma caatinga e cerrado, respectivamente (Embrapa, 2015). Esses ecossistemas são responsáveis por atuar com cerca de 46 % na economia (Conab, 2020).

Os biomas Caatinga e Cerrado brasileiros são ecossistemas distintos, mas interconectados. Cada um exibindo biodiversidade única e enfrentando desafios significativos de conservação. O Cerrado, abriga uma rica variedade de anfíbios endêmicos e fungos micorrízicos arbusculares, enquanto a Caatinga, um ecossistema de terras secas, com espécimes variadas e que se adaptaram para suportar longos períodos de seca (IBGE, 2020; Do Lago Santana *et al*., 2024; Gomes *et al*., 2024).

A diversidade de fungos micorrízicos arbusculares do Cerrado é crucial para a saúde das plantas. Com 82 espécies de fungos micorrízicos identificadas, particularmente em áreas de transição para a Caatinga (Pontes *et al*., 2024; Gomes *et al*., 2024). A vegetação da Caatinga é caracterizada por diversas comunidades vegetais, que são essenciais para manter o equilíbrio ecológico (Da Silva *et al*., 2023).

Tais condições ambientais, tornam o Brasil uma terra única no mundo, quanto a fonte de inúmeras plantas medicinais, historicamente utilizadas para tratamento de diversas doenças. A integração dessas plantas na medicina moderna destaca seu potencial no desenvolvimento de novos compostos bioativos (Gomes Da Costa *et al*., 2023). As espécies ricas em fitoquímicos, incluindo terpenos, flavonoides e óleos essenciais, que exibem várias atividades biológicas (De Carvalho; Conte-Junior, 2021; Borsoi, 2024).

Estudos mostraram que extratos de plantas brasileiras demonstram atividade antimicrobiana significativa contra vários patógenos, incluindo bactérias e fungos (Queiroz *et al*., 2023). As propriedades antimicrobianas desses compostos sugerem seu uso potencial no tratamento de infecções e no enfrentamento da resistência antimicrobiana (Suffredini *et al*., 2023). Os compostos bioativos da flora brasileira estão sendo explorados por seus papéis na prevenção e tratamento de doenças como câncer, diabetes e distúrbios cardiovasculares (De Carvalho; Conte-Junior, 2021). Óleos

essenciais de plantas nativas estão sendo considerados para uso em sistemas alimentares e cosméticos devido aos seus benefícios à saúde (Borsoi *et al*., 2024).

Neste enfoque, as espécies dos gêneros *Citrus* e *Spondias* têm importância significativa no Brasil, devido suas amplas distribuição no território e às suas aplicações nutricionais, medicinais e industriais. Ambos os gêneros são ricos em compostos bioativos que contribuem para benefícios à saúde e têm usos potenciais em tecnologia de alimentos e produtos farmacêuticos (De Moraes; De Castro; Genovese, 2012; Galvan-Lima, 2021; De Freitas *et al*., 2024).

2.2 Gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* abrange um grupo diverso de plantas conhecidas por seu significativo valor nutricional, medicinal e econômico. Com mais de 1300 espécies, as frutas cítricas são cultivadas globalmente, principalmente em climas tropicais e subtropicais. Este gênero é caracterizado por sua taxonomia complexa e rica composição fitoquímica, o que contribui para vários benefícios à saúde e aplicações em várias indústrias. *Citrus* pertence à família Rutaceae. A taxonomia do gênero é complexa, Swingle e Tanaka, dois sistemas principais de classificação, identificando cerca de 36 espécies (Raghuvanshi, 1962; Hazarika; Hazarika; Shukla, 2014; Ollitrault; Curk; Krueger, 2020).

A ocorrência do gênero *Citrus* no Brasil é significativa devido à sua importância econômica e condições ecológicas favoráveis. Sendo o maior exportador mundial de suco cítrico, respondendo por 40% da produção de laranja doce e 60% do processamento de suco globalmente (Passos *et al*., 2015). As espécies do gênero *Citrus*, ocorrem em todas as regiões: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Pirani, 2015; Pirani; Groppo, 2020).

As frutas cítricas das espécimes desse gênero são ricas em flavonoides, ácidos fenólicos e óleos essenciais, contribuindo para suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Parwinder *et al*., 2023). Estudos epidemiológicos associam o consumo de frutas cítricas à redução de riscos de várias doenças, incluindo ansiedade e transtornos de humor (Kaur *et al*., 2024) (Parwinder *et al*., 2023). Extratos cítricos são utilizados em alimentos, cosméticos e produtos ecológicos, demonstrando sua

versatilidade (Hamid *et al*., 2023). Além de que, seus resíduos do processamento de frutas possuem potenciais aplicações agrícolas e podem ser convertidos em biocombustíveis (Hamid *et al*., 2023).

2.3 Gênero Spondias

O gênero *Spondias* pertence à família Anacardiaceae, mesma família do cajueiro, e possui cerca de 18 espécies distribuídas nas regiões tropicais, Ásia e Oceania. No Nordeste brasileiro, destacam-se as espécies: *Spondias mombin* L. (cajazeira), *Spondias purpurea* L. (serigueleira), *Spondias cytherea* Sonn. (cajaraneira), *Spondias tuberosa* Arr. Câm. (umbuzeiro) e *Spondias* spp. (umbu-cajá e umbuguela), sendo árvores frutíferas largamente exploradas. Estas espécies são plantas em domesticação que produzem frutos do tipo drupa (fruto carnoso com apenas uma semente) e de boa aparência, qualidade nutritiva, aroma e sabor agradáveis, os quais são muito apreciados para o consumo como fruta fresca ou na forma processada como polpa, sucos, doces, néctares, picolés e sorvetes (Souza, 1998; Silva-Luz; Pirani, 2015; Bfg, 2021; Silva; Agra, 2021).

A *Spondias purpurea* L. árvore que produz a seriguela, fruto tipo drupa de cor vermelho-escura quando maduro, possui polpa de coloração amarela, aroma e sabor agradáveis (Nogueira *et al*., 2014) é muito apreciada no Nordeste brasileiro. Refletido pelo contínuo aumento do consumo da fruta in natura ou processada na forma de diversos produtos, normalmente disponibilizados no mercado, o que tem proporcionado crescente interesse para seu cultivo comercial (Silva; Agra, 2021).

Além disso, o gênero *Spondias* abrange várias espécies com aplicações biotecnológicas significativas, particularmente em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Essas espécies, como *Spondias mombin* e *Spondias tuberosa*, são ricas em compostos bioativos que oferecem vários benefícios à saúde e usos industriais. Os frutos de *Spondias* são ricos em compostos bioativos, incluindo fenólicos e flavonoides, que contribuem para suas propriedades antioxidantes (De Freitas *et al*., 2024) (Sameh et al., 2018). Eles estão sendo explorados como ingredientes em alimentos funcionais, como farinhas e iogurtes, aumentando o valor nutricional e os benefícios à saúde (Silva; Agra, 2021). Extratos de espécies de *Spondias* exibem atividades inibitórias enzimáticas significativas, sugerindo potencial no tratamento de condições como diabetes e doenças neurodegenerativas (Sinan *et al*., 2021) (Sameh *et al*., 2018).

As propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas dessas plantas as posicionam como candidatas para o desenvolvimento de novos agentes

terapêuticos (Da Silva *et al*., 2014). As propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos extratos de *Spondias* os tornam adequados para uso em formulações cosméticas, promovendo a saúde da pele (Sinan *et al*., 2021) (Sameh *et al*., 2018). Embora o potencial das espécies de *Spondias* seja evidente, suas aplicações permanecem pouco exploradas, indicando a necessidade de mais pesquisas para aproveitar totalmente seus benefícios em várias indústrias.

2.4 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são biopolímeros de estruturas complexas, que podem ser formados por uma ou mais unidades de carboidratos. De acordo com essa característica pode ser classificado como mono, di ou polissacarídeo. Esses, podem ser obtidos de diversas fontes naturais (Saraswat *et al*., 2023).

Características estruturais e propriedades físico-químicas que os polissacarídeos possuem, incluindo a solubilidade em água, peso molecular, composição monomérica, tipos de ligações glicosídicas da cadeia principal e das ramificações, podem contribuir para uma boa atividade biológica (Ding; Hou; Hou, 2012). Pode-se associar também sua atividade com outras macromoléculas, a exemplo das proteínas (Chen *et al*., 2016).

O exsudato de uma planta, rico em polissacarídeos, pode ser definido como um fluido que percorre o tronco da árvore, produzido pelas células epiteliais de plantas. Quando o córtex sofre alguma agressão, seja por injúria física ou ataque microbiano, a planta libera o exsudato para a proteção contra infecções e dissecação (Bemiller; Huber, 2010; Porto, 2018). Além disso, o processo de exsudação inicia-se como um mecanismo defensor que se desenvolve, principalmente, em áreas semiáridas (Andrade *et al*., 2013). Este é um líquido com aspecto viscoso que ao ficar exposto ao ar, endurece (Nussinovitch, 2010).

Os polissacarídeos extraídos das plantas apresentam em sua totalidade uma maior concentração de carboidratos de elevada massa molar, compostos de unidades monossacarídicas conectados por ligações glicosídicas (Buriti *et al*., 2014; Cerqueira *et al*., 2011). Logo, é importante destacar que os polissacarídeos ganham destaque devido seu alto peso molecular, o que faz com que estas moléculas despertem grandes interesses, devido a sua variedade e aplicação. Dessa forma, as gomas podem ser determinadas como substâncias poliméricas com amplo potencial de compor soluções, dispersões com elevada viscosidade chegando à consistência até mesmo de gel (Cunha; Paula; Feitosa, 2009).

A busca pelo uso de polissacarídeos bioativos em diversas terapias humanas é devido à segurança e baixa toxicidade que geralmente apresentam (Yu *et al*., 2017). Sendo assim, vários estudos comprovam as atividades biológicas complexas de polissacarídeos, com pesquisas avançando com foco em estudos de estrutura-atividade e mecanismos de ação desses polissacarídeos, inclusive de gomas (Shi, 2016).

2.5 Gomas

As gomas são polissacarídeos naturais oriundos de macroalgas, de plantas (podendo ser retiradas dos exsudatos, das sementes das árvores e/ou arbustos), produzidas por micro-organismos (Lima *et al*., 2002; Carignatto, 2012) ou advindos de alterações químicas produzidas pelos organismos (Porto, 2018).

Boa parte destas gomas, são polímeros de cadeia extensa, hidrossolúveis e apresentam propriedade de intumescimento (Porto, 2018). Estes polímeros apresentam a capacidade de formação de gel ou dispersão de alta viscosidade, tais características se devem à sua concentração no meio. Assim, podem ser aplicados como agentes emulsificantes e suspensores (Zhang *et al*., 2024).

As gomas apresentam propriedades e características especificas que variam de acordo com a sua estrutura molecular (Guo *et al*., 2025). São exemplos de gomas de exsudato de plantas a goma arábica (Gashua; Williamns; Baldwin, 2016), goma do cajueiro (Ribeiro *et al*., 2016), goma Karaya (Nussinovitch, 2010), goma persa e goma tragacanto (Teimouri; Abbasi; Sheikh, 2016) e goma do angico (Silva; Rodrigues; Paula, 1998). Cada goma possui características intrícicas, que podem interferir diretamente na sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e produção de biomateriais. O estudo dessas características são essências para novos biopolímeros (Elango *et al*., 2023)

REFERÊNCIAS

ANDRADE, KELITA CS et al. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, v. 23, n. 5, p. 667-671, 2013.

BEMILLER, J.N.; HUBER, K.C. Carbohidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Quimica de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed,4th Ed., 2010.

BENALAYA, Ikbel et al. A review of natural polysaccharides: Sources, characteristics, properties, food, and pharmaceutical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1322, 2024.

BFG. Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. Taxon. 2021. (https://doi.org/10.1002/tax.12640).

BORSOI, Felipe Tecchio et al. Essential Oils from Native Brazilian Plants of the Genus Eugenia as an Innovative and Sustainable Source of Active Ingredients for Food Systems and Human Health and Well-Being. **Horticulturae**, v. 10, n. 7, p. 768, 2024.

BURITI, Flávia CA et al. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from Caesalpinia pulcherrima seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521, 2014.

CAFFALL, Kerry Hosmer; MOHNEN, Debra. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.

CARIGNATTO, C.R. R. Aspectos nutricionais na produção e qualidade da goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. campestris. 2012.

CERQUEIRA, M. A. et al. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 12, p. 662-671, 2011.

CHEN, Yue; ZHANG, Na; CHEN, Xiaoqiang. Structurally Modified Polysaccharides: Physicochemical Properties, Biological Activities, Structure–Activity Relationship, and Applications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 72, n. 7, p. 3259-3276, 2024.

CHEN, Yun et al. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1705, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Conab. Boletim Sociobiodiversidade, volume 1, n. 4, 2017.

CONAB. Balança Comercial do Agronegócio do Nordeste 2018-2019. **Caderno Setorial ETENE**, 2020.

CUNHA, Pablyana Leila R. da; PAULA, Regina Célia M. de; FEITOSA, Judith P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DA SILVA, Ana Paula Bezerra; AGRA, Mário Diniz. Caracterização e Monitoramento das aplicações químicas da espécie Spondias purpurea L. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, 2022.

DA SILVA, Gabriel Araujo; DE BRITO, Naira Josele Neves; DOS SANTOS, Elizabeth Cristina Gomes. GÊNERO Spondias:: ASPECTOS BOTÂNICOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL FARMACOLÓGICO. **BIOFARM-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 1, p. 27-41, 2014.

DA SILVA, Maria Virginia Oliveira; DE ARAÚJO, Francisca Soares; LEDRU, Marie-Pierre. A palynological atlas of the Cerrado-Caatinga ecotone in northeastern Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 321, p. 105023, 2024.

DARGE, Haile Fentahun et al. Polysaccharide and polypeptide based injectable thermo-sensitive hydrogels for local biomedical applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 133, p. 545-563, 2019.

DE CARVALHO, Anna Paula Azevedo; CONTE-JUNIOR, Carlos Adam. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 534-548, 2021.

DE FREITAS, Jaqueline Souza et al. Spondias tuberosa and Spondias mombin: Nutritional Composition, Bioactive Compounds, Biological Activity and Technological Applications. **Resources**, v. 13, n. 5, p. 68, 2024.

DE MORAES BARROS, Helena Rudge; DE CASTRO FERREIRA, Tânia Aparecida Pinto; GENOVESE, Maria Inés. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1892-1898, 2012.

DE PONTES, Juliana Souza et al. Heterogeneity in arbuscular mycorrhizal fungi and plant communities of the Brazilian Cerrado, transitional areas toward the Caatinga, and the Atlantic forest. **Microbial Ecology**, v. 87, n. 1, p. 29, 2024.

DE QUEIROZ, José Carlos Eloi; LEITE, José Roberto SA; VASCONCELOS, Andreanne Gomes. Prospecting plant extracts and bioactive molecules with antimicrobial activity in Brazilian biomes: a review. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 427, 2023.

DE SOUZA, F. X. Spondias agroindustriais e os seus métodos de propagação (frutas tropicais: cajá, ciriguela, cajarana, umbu, umbu-cajá e umbuguela). 1998.

DING, X.; HOU, Yi-ling; HOU, Wan-ru. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from Boletus speciosus Forst. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 613-618, 2012.

DO LAGO SANTANA, Gisele et al. Endemic amphibians of the Cerrado and Caatinga: species richness, geographic range and conservation. **Herpetological Journal**, v. 34, n. 2, p. 116-126, 2024.

DU, Bin; JEEPIPALLI, Syam PK; XU, Baojun. Critical review on alterations in physiochemical properties and molecular structure of natural polysaccharides upon ultrasonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 90, p. 106170, 2022.

ELANGO, Boojhana et al. Structural diversity, functional versatility and applications in industrial, environmental and biomedical sciences of polysaccharides and its derivatives–A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 126193, 2023.

EMBRAPA. Oportunidades para o desenvolvimento agropecuário e social nos biomas do nordeste desafios e oportunidades para o desenvolvimento agropecuário e social nos biomas do nordeste brasileiro. 2015.

GALVAN-LIMA, Ângela et al. Headspace volatolome of peel flours from citrus fruits grown in Brazil. Food Research International, v. 150, p. 110801, 2021.

GASHUA, I.B.; WILLIAMS, P.A.; BALDWIN, T.C. Características moleculares, propriedades de associação e interfaciais da goma arábica colhida de *Acacia senegal* e *Acacia seyal*. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 514-522, 2016.

GOMES DA COSTA, Matheus et al. IMPACTS OF THE USE OF BRAZILIAN FAUNA AND FLORA IN FOOD AND MEDICINAL USE. **Environmental & Social Management Journal/Revista de Gestão Social e Ambiental**, v. 18, n. 1, 2024.

GOMES, Maria Thereza Dantas et al. Revealing floristic and structural variation in regenerating areas in the Cerrado-Caatinga transition: an analysis across seres. **Rodriguésia**, v. 75, p. e00112022, 2024.

GUO, Yalong et al. Uncovering the effect of molecular structure on the rheology of welan gum by viscoelastic characterization, density functional theory and molecular dynamics simulation. **Food Hydrocolloids**, p. 111074, 2025.

HAMID, Sania et al. Types and Cultivation of Citrus Fruits. In: **Citrus Fruits and Juice: Processing and Quality Profiling**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 17-43.

HAZARIKA, T. K.; HAZARIKA, B. N.; SHUKLA, A. C. Genetic variability and phylogenetic relationships studies of genus Citrus L. with the application of molecular markers. **Genetic resources and crop evolution**, v. 61, p. 1441-1454, 2014.

HU, Ting et al. Influencing factors on the physicochemical characteristics of tea polysaccharides. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3457, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. O uso da terra nos biomas brasileiros 2000-2018. Rio de Janeiro, 2020.

LIMA, R. S. N.; LIMA, J. R.; SALIS, C.R.; MOREIRA, R.A. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exsudate gum: a novel biologand tool. **Biotechnology and Applies Bioochemistry**, v.35, p.45-53,2002.

MOHAMMED, Aiman Saleh A.; NAVEED, Muhammad; JOST, Norbert. Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, p. 2359-2371, 2021.

NOGUEIRA, Juliete Pedreira; DE JESUS, Maria Antônia Carvalho Lima. Desenvolvimento, avaliação físico-química, sensorial e colorimétrica da geleia de seriguela diet. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2S, 2014.

NUSSINOVITCH, A. Plant gum exsudates of the world. Boca Raton: CRC Press, 2010.

OLLITRAULT, Patrick; CURK, Franck; KRUEGER, Robert. Citrus taxonomy. In: **The genus citrus**. Woodhead Publishing, 2020. p. 57-81.

PARWINDER, Singh., RAHUL, Sharma., RAMANDEEP, Kaur., PUSKAR, Mehta., Pankaj., NEELAM, Sharma., SHAILESH, Sharma. Citrus Genus and its Pharmacological Activities: A Review. **Journal of pharmaceutical technology research and management**, 11(1):39-48. 2023.

PASSOS, Orlando S. et al. São Francisco river valley as a new belt for the Brazilian citrus industry. **Acta Horticulturae**, v. 1065, p. 1925-1930, 2015.

PIRANI, J.R. 2015. Citrus in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB361)

PIRANI, J.R., Groppo, M. Rutaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB361).

PIRŠELOVÁ, B.; MATUŠÍKOVÁ, I. Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 635-644, 2013.

PORTO, Bruna Castro; CRISTIANINI, Marcelo. Effect of dynamic high pressure on emulsifying and encapsulant properties of cashew tree gum. **Carbohydrate polymers**, v. 186, p. 350-357, 2018.

RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in genus Citrus. **Cytologia**, v. 27, n. 2, p. 172-188, 1962.

RAMAPRABHA, K. et al. Exploring the diverse applications of Carbohydrate macromolecules in food, pharmaceutical, and environmental technologies. **Environmental Research**, v. 240, p. 117521, 2024.

RIBEIRO, A.J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 147, p. 188-200, 2016.

SAAVEDRA-LEOS, Zenaida et al. Technological application of maltodextrins according to the degree of polymerization. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21067-21081, 2015.

SAMEH, Salma et al. Genus Spondias: A phytochemical and pharmacological review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 5382904, 2018.

SARASWAT, Pooja et al. Applications of bio-based nanomaterials in environment and agriculture: a review on recent progresses. **Hybrid Advances**, p. 100097, 2023.

SHARMA, Swati; BHENDE, Manisha. An overview: non-toxic and eco-friendly polysaccharides—its classification, properties, and diverse applications. **Polymer Bulletin**, p. 1-47, 2024.

SHI, Lei. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International jornal of biological macromolecules**, v. 92, p. 37-48, 2016.

SILVA, A. G., RODRIGUES, J. F., DE PAULA, R. C. M. Composição e Propriedades Reológicas da Goma do Angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). Polímeros: Ciência e Tecnologia. 1998.

Silva-Luz, C.L.,Pirani, J.R. 2015. Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB4402)

SINAN, Kouadio Ibrahime et al. Exploring the chemical profiles and biological values of two Spondias species (S. dulcis and S. mombin): Valuable Sources of Bioactive Natural Products. **Antioxidants**, v. 10, n. 11, p. 1771, 2021.

SUFFREDINI, Ivana Barbosa et al. Screening Amazon rainforest plant extracts for antimicrobial activity: a 15-year commitment to the Brazilian biodiversity. **Frontiers in Antibiotics**, v. 2, p. 1122400, 2023.

TEIMOURI, S.; ABBASI, S.; SHEIKH, N.Effects of gamma irradiation on some physicochemical and rheological properties of Persian gum and gum tragacanth. **Food Hydrocolloids**, v. 59, p. 9-16, 2016.

WANG, Zichao et al. Regulation strategy, bioactivity, and physical property of plant and microbial polysaccharides based on molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 244, p. 125360, 2023.

YU, Yue et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **CarbohydratePolymers,** 2017

ZHANG, Han et al. Developing natural polymers for skin wound healing. **Bioactive Materials**, v. 33, p. 355-376, 2024.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as propriedades fisico-quimicas, estruturais e biológicas de polissacarídeos extraídos de exsudatos de plantas da espécie *Citrus* × *latifolia* (limoeiro) e da espécie *Spondias purpurea* (serigueleiro).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, purificar as gomas da espécie *Citrus* × *latifolia* (limoeiro) e da espécie *Spondias purpurea* (serigueleiro);
- Caracterizar a estrutura, carga superficial, composição, carateristicas físico-químicas e termogravimétricas das gomas do limoeiro e do serigueleiro;
- Verificar a biocompatibilidade *in vitro* das gomas do limoeiro e do serigueleiro em diferentes linhagens celulares;
- Realizar o teste de biocompatibilidade *in vivo* das gomas do limoeiro e do serigueleiro em dois modelos distinos.

CAPÍTULO 1 – PUBLICADO

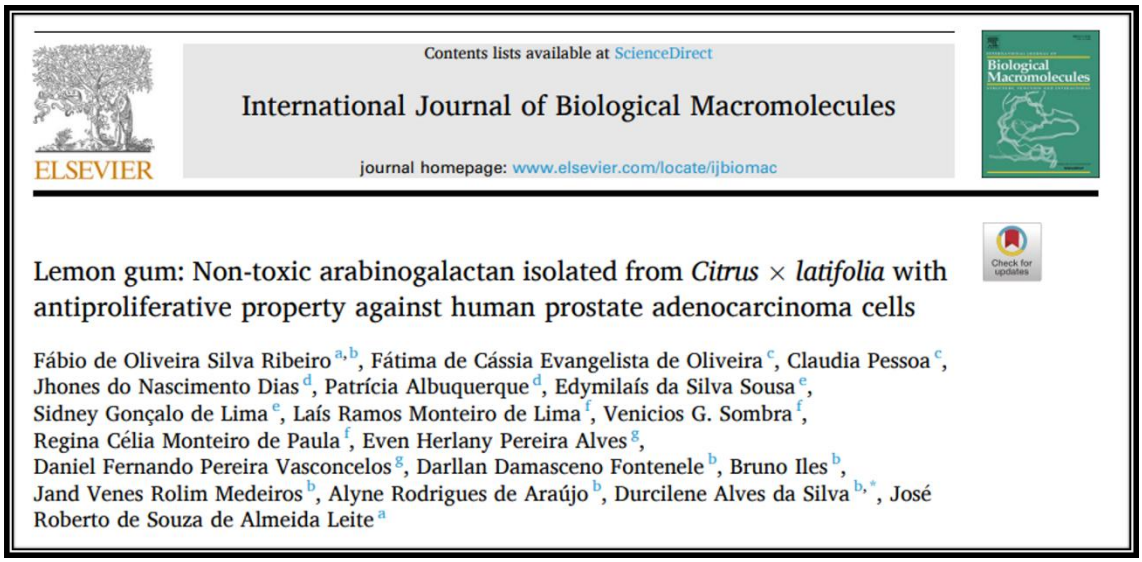
PERIÓDICO: International Journal of Biological Macromolecules

Fator de Impacto: 7,7

QUALIS A1 em Ciências Médicas

Doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.277

GOMA DE LIMOEIRO: UMA ARABINOGALACTANA NÃO TÓXICA ISOLADA DE *Citrus* × *latifolia* COM PROPRIEDADE ANTIPROLIFERATIVA CONTRA CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Lemon gum: Non-toxic arabinogalactan isolated from *Citrus* × *latifolia* with antiproliferative property against human prostate adenocarcinoma cells

Fábio de Oliveira Silva Ribeiro [a,b], Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira [c], Claudia Pessoa [c], Jhones do Nascimento Dias [d], Patrícia Albuquerque [d], Edymilaís da Silva Sousa [e], Sidney Gonçalo de Lima [e], Laís Ramos Monteiro de Lima [f], Venicios G. Sombra [f], Regina Célia Monteiro de Paula [f], Even Herlany Pereira Alves [g], Daniel Fernando Pereira Vasconcelos [g], Darllan Damasceno Fontenele [b], Bruno Iles [b], Jand Venes Rolim Medeiros [b], Alyne Rodrigues de Araújo [b], Durcilene Alves da Silva [b,*], José Roberto de Souza de Almeida Leite [a]

Nota: O artigo apresentado a seguir encontra-se traduzido para a língua portuguesa, com perfil formatação seguindo as normas de submissão exigidas pela ABNT.

RESUMO

A goma de limoeiro (GL) obtida de *Citrus* × *latifolia* no Brasil foi isolada e caracterizada. Além disso, a biocompatibilidade da goma foi avaliada *in vitro* (células não tumorais e tumorais) e *in vivo* (*Galleria mellonella* e modelo de toxicidade aguda em camundongos). A proporção entre os monossacarídeos encontrados na GL foi 1:0,65:0,06:0,15 para arabinose:galactose:ramnose:4-OMe-ácido glucurônico. Pequenos traços de proteína foram detectados, enfatizando a pureza do isolado. A massa molar foi de $8{,}08\times10^5$ g/mol, com três eventos de degradação diferentes observados na análise térmica. A GL apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer de adenocarcinoma de próstata humano, com porcentagem superior a 50%. Os modelos de toxicidade *in vivo* demonstraram que a GL é um polímero biocompatível, com pouca diferença nos parâmetros em comparação ao grupo controle. Esses resultados demonstram avanço no estudo da composição e toxicidade da GL, indicando um potencial para diversas aplicações biomédicas e biotecnológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Biopolímero, caracterização química, biocompatibilidade.

ABSTRACT

Lemon gum (LG) obtained from *Citrus* × *latifolia* in Brazil was isolated and characterized. In addition, gum biocompatibility was evaluated *in vitro* and *in vivo* by *Galleria mellonella* and mice model. The cytotoxicity against tumor cells was also evaluated. The ratio of arabinose:galactose: rhamnose:4-OMe-glucuronic acid was 1:0.65:0.06:0.15. Small traces of protein were detected, emphasizing the isolate purity. Molar mass was 8.08×10^5 g/mol, with three different degradation events. LG showed antiproliferative activity against human prostate adenocarcinoma cancer cells, with percentage superior to 50%. *In vivo* toxicity models demonstrated that LG is biocompatible polymer, with little difference in the parameters compared to control group. These results demonstrate advance in the study of LG composition and toxicity, indicating a potential for several biomedical and biotechnological future applications.

KEYWORDS: Biopolymer, chemical characterization, biocompatibility.

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista a diversidade florística nativa brasileira, o investimento no desenvolvimento biotecnológico de produtos naturais é necessário, pois o uso consciente e sustentável dos recursos naturais favorece o equilíbrio entre exploração e preservação (Da Silva *et al*., 2018). O limoeiro é amplamente utilizado pela população devido ao consumo frequente de frutos. Esta árvore e as partes, como caule, folhas, raiz, flores, frutos e sementes, têm amplos e bem estabelecidos relatos de importantes atividades biológicas. Vale ressaltar que esta espécie tem aplicações etnofarmacológicas, como emagrecedor; frieiras, tosse (Passalacqua; Guarrera; De Fine, 2007), antileishmania (Gachet *et al*., 2010), antibacteriano, anti-inflamatório, anti-helmíntico (Arias; Ramón-Laca, 2005), cefaleia (Posso *et al*., 2010), icterícia, caspa, febre (Silambarasan; Ayyanar, 2015) e antitumoral (Caetano *et al*., 2015). Outras atividades como contra resfriado, analgésico, antianêmico, antidiarreico, (Alarcón *et al*., 2015) antimalárico (Kffuri *et al*., 2016), dislipidemia, obesidade, diabetes tipo 2 e antiemético (Esakkimuthu *et al*., 2016), prevenindo doenças cardiovasculares (Khan *et al*., 2018), também foram relatadas.

Gomas são polissacarídeos compostos de diferentes unidades de monossacarídeos (galactose, arabinose, ramnose, átomos urônicos, etc.), que são ligados por ligações glicosídicas (1→3 ligado, 1→6 ligado, etc.). Esses produtos podem ser obtidos por meio de um fenômeno exsudativo, uma resposta fisiológica a lesões mecânicas ou biológicas, ou por meio da extração de tecidos vegetais. Gomas obtidas de exsudatos são geralmente solúveis em água devido à presença de hidroxilas na estrutura química. Eles também podem formar géis em soluções aquosas, que são principalmente quimicamente biocompatíveis, não tóxicos, biodegradáveis e de prática obtenção (Saha *et al*., 2017).

Os primeiros estudos com dados da goma do limoeiro (GL) de 1936, Anderson, Russel e Seigle (1936). mostram a presença de galactose, arabinose e ácido glucurônico. Estudos posteriores, usando hidrólise parcial, demonstraram a presença dos principais açúcares previamente identificados, mas também incluíram ramnose e ácido 4-O-metil glucurônico na composição (Connell *et al*., 1950; Andrews; Jones, 1955). Uma investigação mais detalhada foi realizada por Stoddart e Jones (1968), usando metilação parcial para propor as características estruturais deste polímero. Os autores mostraram que a goma possui D-galactose (36%), L-arabinose (33%), L-ramnose (5%), ácido D-glucurônico (7%) e ácido 4-O-metil-D-glucurônico (16%). A estrutura sugerida para a goma de limão indica uma cadeia principal composta por β-D-galactopiranose (β-D-Galp) ligada (1→3) e (1→6) com ramificação de β-D-Galp (1→6). L-arabinopiranose,

L-arabinofuranose, L-ramnopiranose, ácido D-glicurônico e 4-O-metil-glicurônico estão presentes nas cadeias laterais e como resíduos terminais.

Apesar desses estudos anteriores, nenhuma investigação adicional foi feita em GL isoladas no mundo e especialmente no Brasil. Além disso, os efeitos promovidos pela GL em sistemas biológicos ainda não foram estudados. Portanto, com base em informações anteriores que foram explicadas, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar (*C.* × *latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka) LG obtidas de Parnaíba-PI, Brasil. Bem como avaliar a toxicidade em três modelos diferentes, incluindo contra células cancerígenas.

2 METODOLOGIA

2.1 Isolamento da GL

Partes da espécime *C.* × *latifolia* foram coletadas, a exsicata foi montada, identificada e posteriormente foi depositada no Herbário Delta do Parnaíba (HDelta), Piauí, sob o nº 5267, bem como registrado no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) (AD8F0F6). O método descrito por Teixeira et al. (2007) foi utilizado para obtenção de goma isolada. Para tanto, foi preparada uma solução aquosa do exsudato (5% p/v). Essa solução foi submetida à filtração e ajuste de pH para 7 (NaOH à 1 $mol.L^{-1}$). Posteriormente, foram adicionados 2 g de cloreto de sódio (NaCl) e agitados por 30 min. Após isso, foi realizada a precipitação com álcool etílico, na proporção de 3:1 (v/v). Por fim, o precipitado foi lavado com álcool etílico, seguido de acetona, e seco sob fluxo de ar quente.

2.2 Cromatografia de exclusão de massa

A distribuição da massa molar foi determinada por cromatografia de exclusão de massa, com o equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a detector de índice de refração (RID-10A). A coluna PolySepLinear (300 × 7,8 mm) foi usada para análise, com 0,1 $mol.L^{-1}$ (aq) $NaNO_3$ como eluente, a 30 °C, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção de amostra de 50 µL. Padrões de Pullulan (P-82, Shodex) foram usados, seguindo a equação:

$$\text{Log}_{M} = 14.33638 - 1.12336 \times Ve$$

2.3 Análise elementar, termogravimétrica e potencial Zeta

A composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio do GL foi obtida por análise elementar, utilizando um analisador Perkin Elmer 2400 Series II CHN, com detector de

condutividade térmica. O fator de conversão utilizado para %N em proteína foi 5,87 (Azero; Andrade, 2002). O potencial Zeta (ζ) (mV) da GL foi obtido pelo equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 utilizando uma solução aquosa de 10 mg/mL. A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada sob fluxo de ar sintético, utilizando o equipamento Shimadzu TGA-50 a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} na faixa de temperatura de 25-700 °C. A taxa de fluxo de ar foi mantida em 60 mL min^{-1}, e a massa inicial da GL foi de 10 mg.

2.4 Hidrólise e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A hidrólise da GL foi realizada com ácido trifluoroacético (TFA). A amostra (10 mg) foi dissolvida em água (1 mL) e mantida sob agitação por 24 horas, então TFA (1 mL, 4 mol/L) foi adicionado e a solução foi colocada em tubo selado, que foi mantido a 100 °C em banho de glicerina por 7 horas. Para eliminar o excesso de ácido, a solução foi lavada com metanol (5×10 mL) e concentrada em banho-maria a 80 °C. A composição foi determinada por HPLC no equipamento Shimadzu LC-20AD. Usando coluna Rezex ™ ROA-Organic Acid H + (8%) (300 × 7,8 mm) e H2SO4 (aq) 8 $mmol.L^{-1}$ como eluente. A identificação foi realizada usando padrões de monossacarídeos.

2. 5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Para obter os espectros de RMN, a amostra de LG (20 mg) foi dissolvida em óxido de deutério (D_2O). Os espectros foram obtidos no equipamento Bruker AVANCE DRX 500 MHz. O 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) foi usado como padrão interno (0,00 ppm para ^1H). Para comparar os resultados com dados da literatura, foram usados outros espectros de padrão interno, o carbono do grupo metil da ramnose, presente na GL, foi corrigido para δ16,4.

2.6 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Testes de citotoxicidade foram realizados nas seguintes linhagens celulares cancerígenas: HCT-116 (carcinoma colorretal humano - concentração de plaqueamento celular: 7×10^4), PC-3 (adenocarcinoma de próstata humano - 1×10^5), SNB19 (glioblastoma humano - 1×10^6), HL60 (leucemia mieloide aguda - 3×10^5) e B16-F10 (melanoma de pele Mus musculus murino - 6×10^4). Linhagens celulares não cancerígenas também foram avaliadas: HEK293 (rim embrionário humano - 1×10^5 - fornecido pelo National Cancer Institute, EUA) e L929 (fibroblasto murino - 7×10^4 - fornecido pelo

Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ). Meio RPMI 1640 (HCT116, PC-3, SNB-19 e HL60) ou Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (B16F10, HEK293 e L929) foram usados para cultivar células, suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (100 μg/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina) e mantidos a 37 °C e atmosfera controlada contendo 5% de CO_2.

A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). As placas tratadas com o composto foram incubadas por 72 h em 5% de CO_2 aquecido a 37 °C. Os experimentos foram analisados de acordo com a média ± desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o software GraphPad Prism 7.01, a partir de um experimento quadruplicado. O IC_{50} foi determinado para as células que no ensaio de concentração única apresentaram a maior porcentagem de inibição do crescimento celular. Para observar as alterações morfológicas causadas pelo GL nas células, foi feita a coloração com Panótico rápido (Laborclin®). O ensaio foi executado em uma placa de 24 poços com lamínulas circulares na parte inferior e incubada com células por 24 h (37 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade). Após esse período, o GL foi adicionado na concentração de IC_{50} previamente determinada e incubado por 48 h nas mesmas condições das plaquetas. Em seguida, as células foram fotografadas em um microscópio óptico (Zeiss, Alemanha).

2.7 Teste de toxicidade *in vivo*

2.7.1 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella*

A avaliação da toxicidade em *G. mellonella* foi realizada de acordo com Balasubramanian et al. (2018), com algumas modificações. Cada grupo experimental consistiu de 16 larvas selecionadas aleatoriamente (250-300 mg). Para o teste, oa GL foi dissolvido em tampão fosfato (PBS), e 10 μL de doses de 50, 25 e 10 mg/kg foram inoculados no último proleg (pata falta) esquerdo de larvas de diferentes grupos, usando uma seringa Hamilton. No grupo controle, as larvas receberam apenas PBS estéril. Após os tratamentos, as larvas foram incubadas a 37 ºC por sete dias e verificadas diariamente para sobrevivência.

2.7.2 Teste para determinação de toxicidade aguda em camundongos

Camundongos Swiss pesando entre 25 e 36 g foram obtidos da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram divididos em dois grupos (n = 5) e mantidos sob

temperatura controlada (22 ± 2 °C) em um ciclo de 12h claro/12h escuro, com consumo monitorado de alimento e água (100 g e 100 mL, respectivamente). Todos os tratamentos, procedimentos e protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Piauí, sob o número 068/14. Para avaliar a toxicidade aguda do GL na dose de 2000 mg/kg, foi utilizada a metodologia clássica de toxicidade aguda oral descrita pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 423/2002 (OECD, 2018), que coordena os ensaios de toxicidade *in vivo*. Os animais foram avaliados segundo parâmetros da triagem hipocrática, conforme proposto por Brito (1994). Durante 14 dias, o consumo de água e alimento foi monitorado, bem como a produção de excretas e aspecto fecal. Parâmetros bioquímicos e hematológicos também foram feitos. Para finalizar, massa média de órgãos e análise histológica de fígado, baço, rim, coração e intestino de animais foram realizados (ALVES et al., 2020).

2.7.3 Análise estatística

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para *G. mellonella* foram geradas e analisadas com o teste log-rank (Mantel-Cox) usando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Para todos os experimentos em camundongos, a média ± erro padrão da média (EPM) foi calculada com base no número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pela comparação entre as médias, realizada pelo “teste t” de Student. A significância estatística foi considerada quando $p< 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

C. × *latifolia* (figura 1A) foi adequadamente identificada e o exsudato foi coletado diretamente da mesma árvore (figura 1B e 1C). O exsudato foi submetido ao isolamento por precipitação com etanol, resultando na minimização de impurezas, e a GL obtida apareceu como um pó branco (figura 1D). Após o isolamento da GL, o biopolímero apresentou um rendimento de 79,3%.

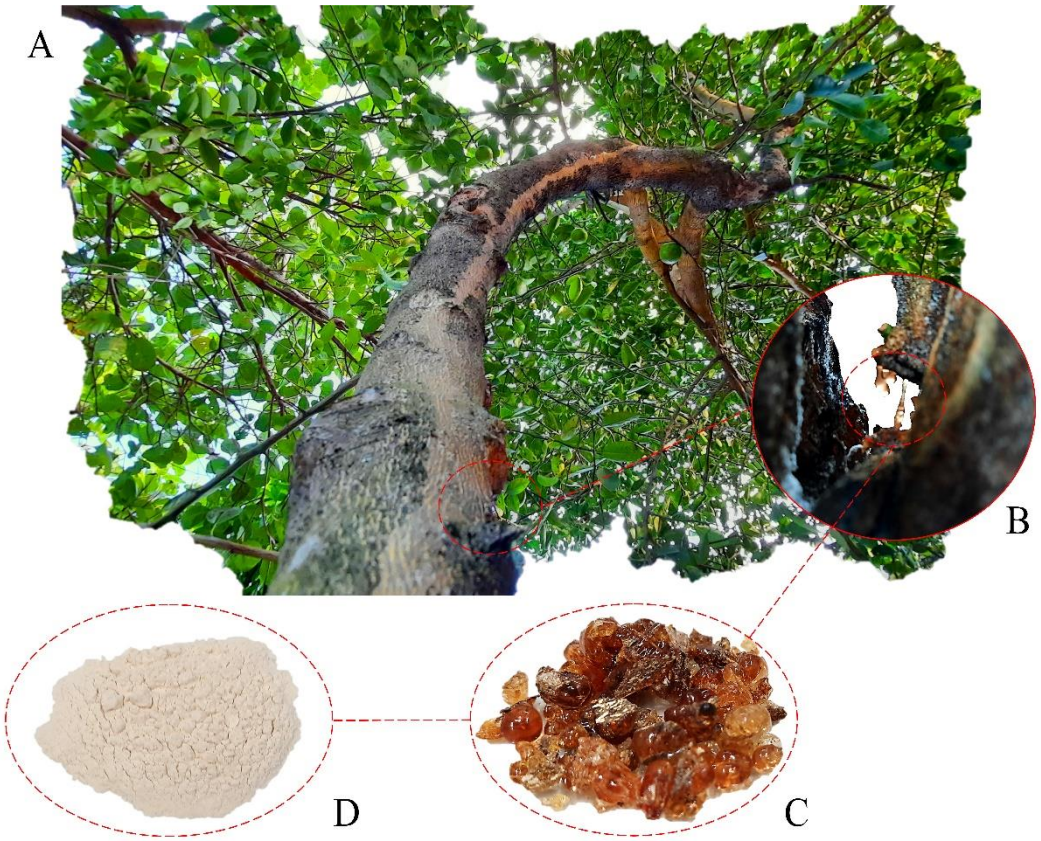


Figura 1. Espécime de C. × latifolia no ambiente, da coleta ao polissacarídeo isolado. Em A: Árvore de *C.* × *latifolia*, em B: Corte do caule demonstrando a liberação natural de exsudato, em C: exsudato coletado, e em D: GL isolado.

3.1 Caracterização do GL

O polissacarídeo GL possui massa molar de $8{,}08\times10^{5}$ $g.mol^{-1}$, sendo assim caracterizado como um polímero de alta massa molecular, com perfil de massa monomodal (figura 2A), corroborando com Stoddart e Jones (1968), que apresentaram massa molar na ordem de 2×10^{6} g/mol para GL. Pela análise elementar, GL apresentou 35,87% de carbono, 5,85% de hidrogênio, seguido de 0,4% de nitrogênio. O último elemento citado pode estar relacionado a pequenos traços de proteína presentes no polímero, então o teor de proteína na goma foi calculado usando fator de conversão, e estimado em 2,35% (De Paula; Rodrigues, 1995).

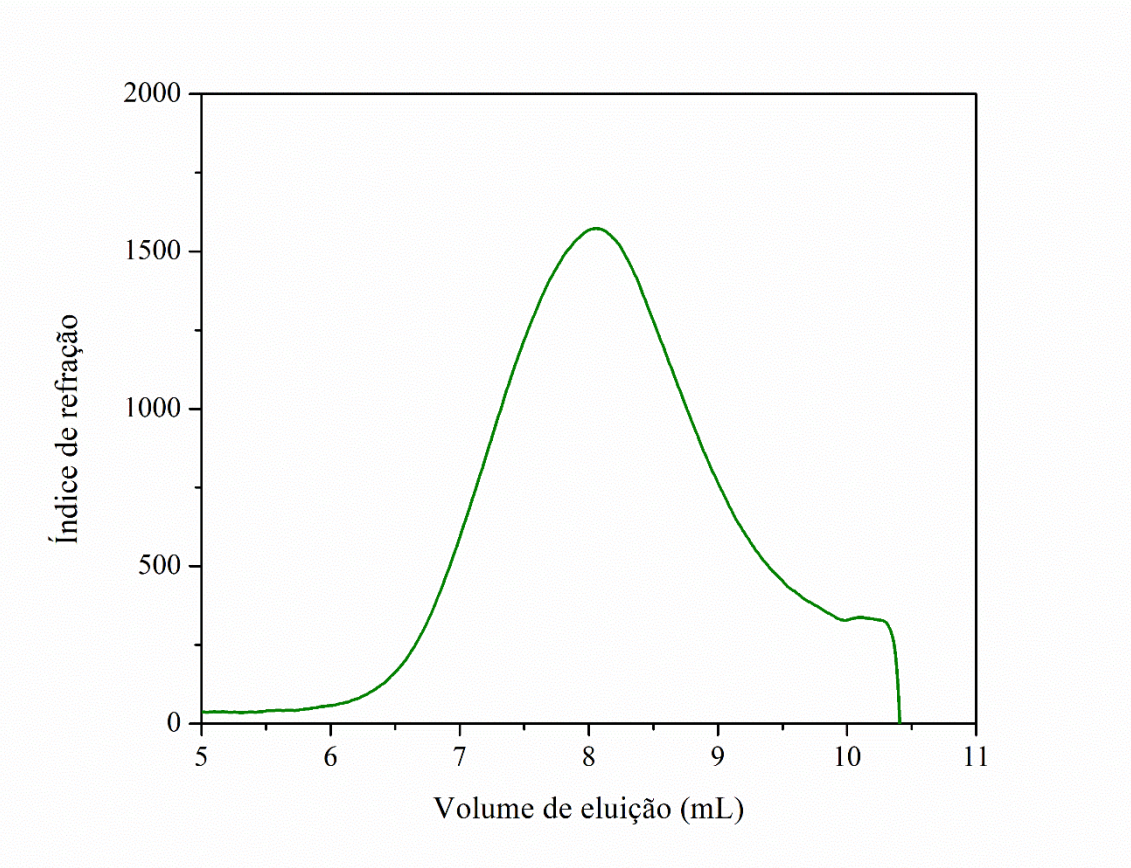


Figura 2. Cromatograma da distribuição da massa molar da GL.

A GL apresentou carga superficial líquida de -35,3 mV. Potencial Zeta negativo (ζ), como relatado para outras gomas, indica um potencial efeito polieletrolítico, melhorando a aplicabilidade potencial como gelificação e emulsificação. Devido a essa característica ζ, as interações goma-íon podem ser usadas na regulação de sistemas de liberação de fármacos (Saha *et al*., 2017; Li; Nie, 2016).

A análise termogravimétrica da GL (figura 3) demonstrou três eventos térmicos, sendo o primeiro a 45,8 ºC, caracterizado por resíduos de baixo peso molecular presentes na goma, como água ligada. O primeiro evento foi caracterizado por 11,84% (1,184 mg) de perda de massa da GL. O segundo evento foi marcado pela perda de 52,92% da massa da goma, o que equivale a 5,292 mg. Este resultado foi caracterizado pela degradação do polímero e observado a 256,3 ºC. O último evento foi observado a 488,3 ºC, onde a massa restante (35,24% - 3,524 mg) foi completamente degradada, culminando na porcentagem residual de 0,37% a 700 ºC (Liyanage *et al*., 2015)

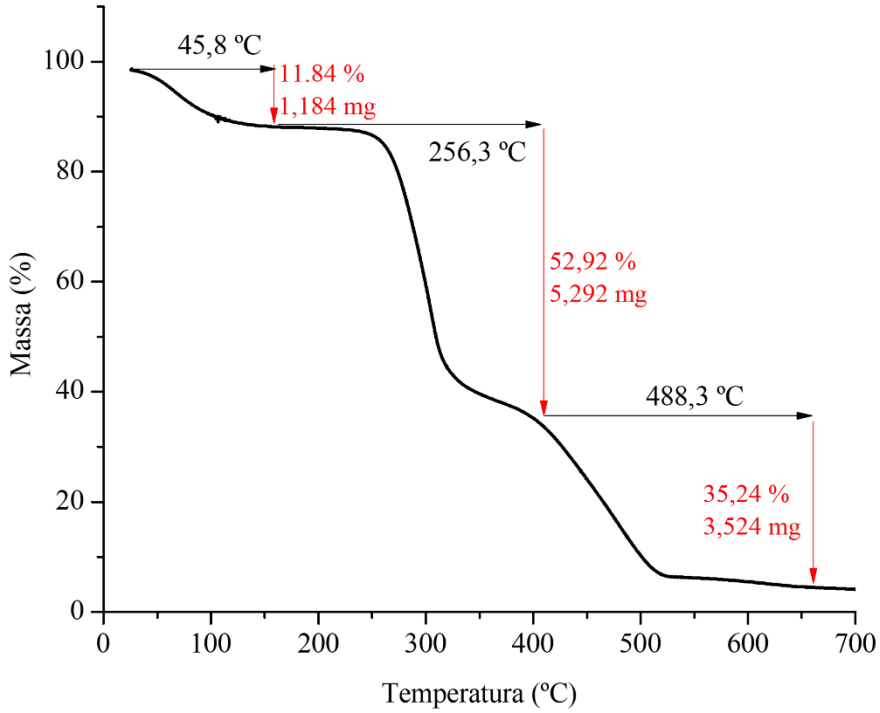


Figura 3. Termograma por análise termogravimétrica (TGA) de GL.

A figura 4 mostra espectros 1D (^{1}H, ^{13}C, DEPT e HSQC) da GL. Na região anomérica (δ 4,40- 5,26) do espectro de RMN de ^{1}H (figura 4A) é possível ver 8 sinais devido a prótons anoméricos, no entanto, no espectro de RMN de ^{13}C (figura 4B) 9 sinais devido a carbonos anoméricos (δ95,5-109,1) podem ser representados. Isso pode ser atribuído a sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^{1}H. O experimento DEPT 135 (figura 4C) confirma que os sinais em 1,25 e 3,48 ppm são causados por grupos metil e que são vários prótons CH_2 (9 sinais em fase oposta aos sinais CH e CH_3). Os sinais foram atribuídos respectivamente ao grupo metil da ramnose e ao ácido 4-O-metil-glucurônico. A presença de sinais C=O em δ176,5 e δ176,3 são devido aos resíduos de ácido 4-OMe-α-D-glucurônico e ácido α-D-glucurônico.

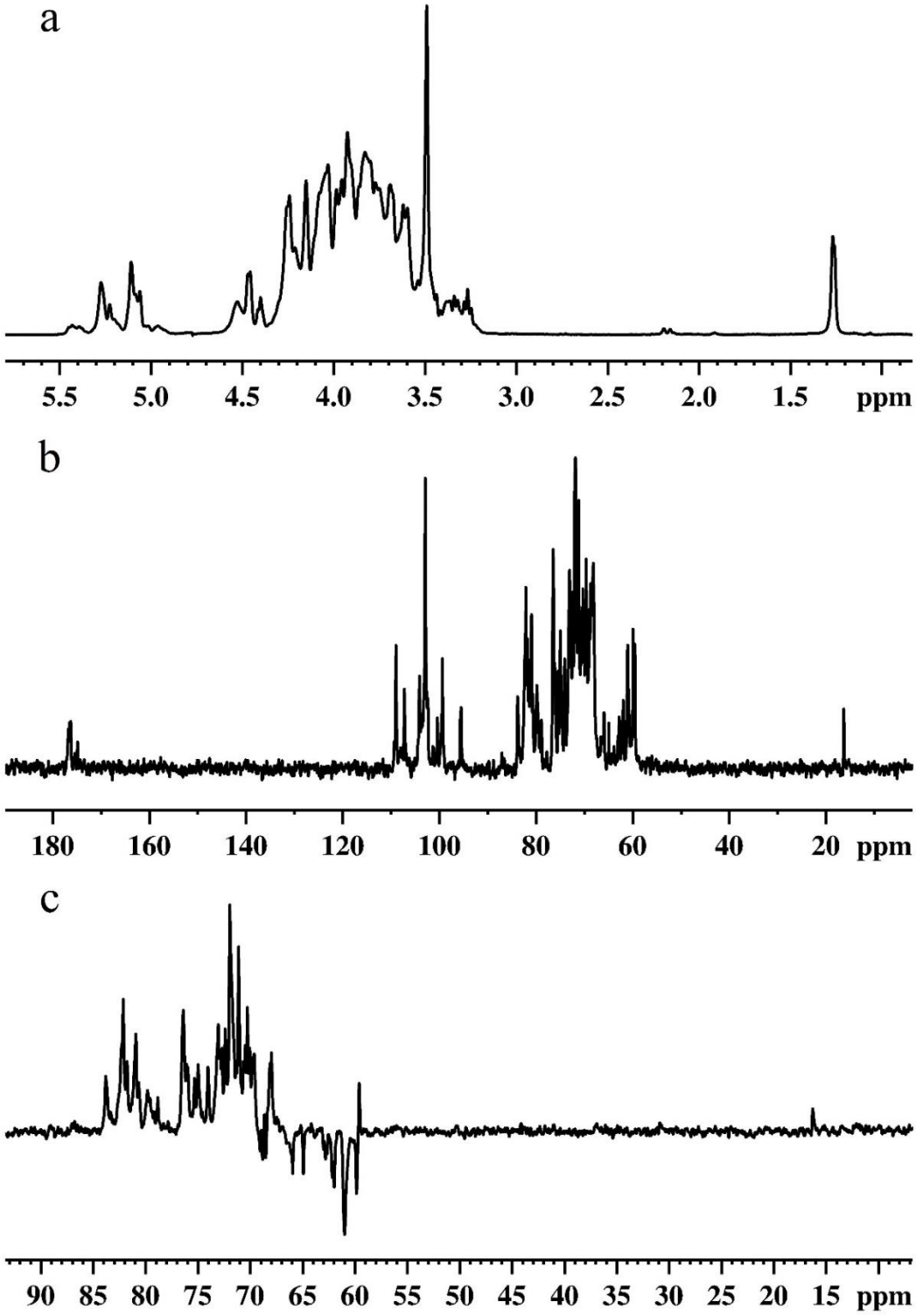


Figura 4. Espectros de RMN 1D da GL em D_2O (A) espectro de RMN de ^{1}H; (B) espectro de RMN de ^{13}C; (C) espectro DEPT 135.

O experimento HSQC foi realizado em D_2O (Figura 5A e B). O sinal C-6/H-6 devido ao grupo metil da ramnose em δ16,3/1,25 (Teixeira *et al*., 2007; Arata *et al*., 2016;

Zhao *et al*., 2017) e a correlação do grupo O-metil em δ59,8/3,48 (Arata *et al*., 2016; Zhao *et al*., 2017; Sznaider *et al*., 2020) podem ser claramente observados no espectro na figura 3D pela presença do ácido 4-O-metil glucurônico.

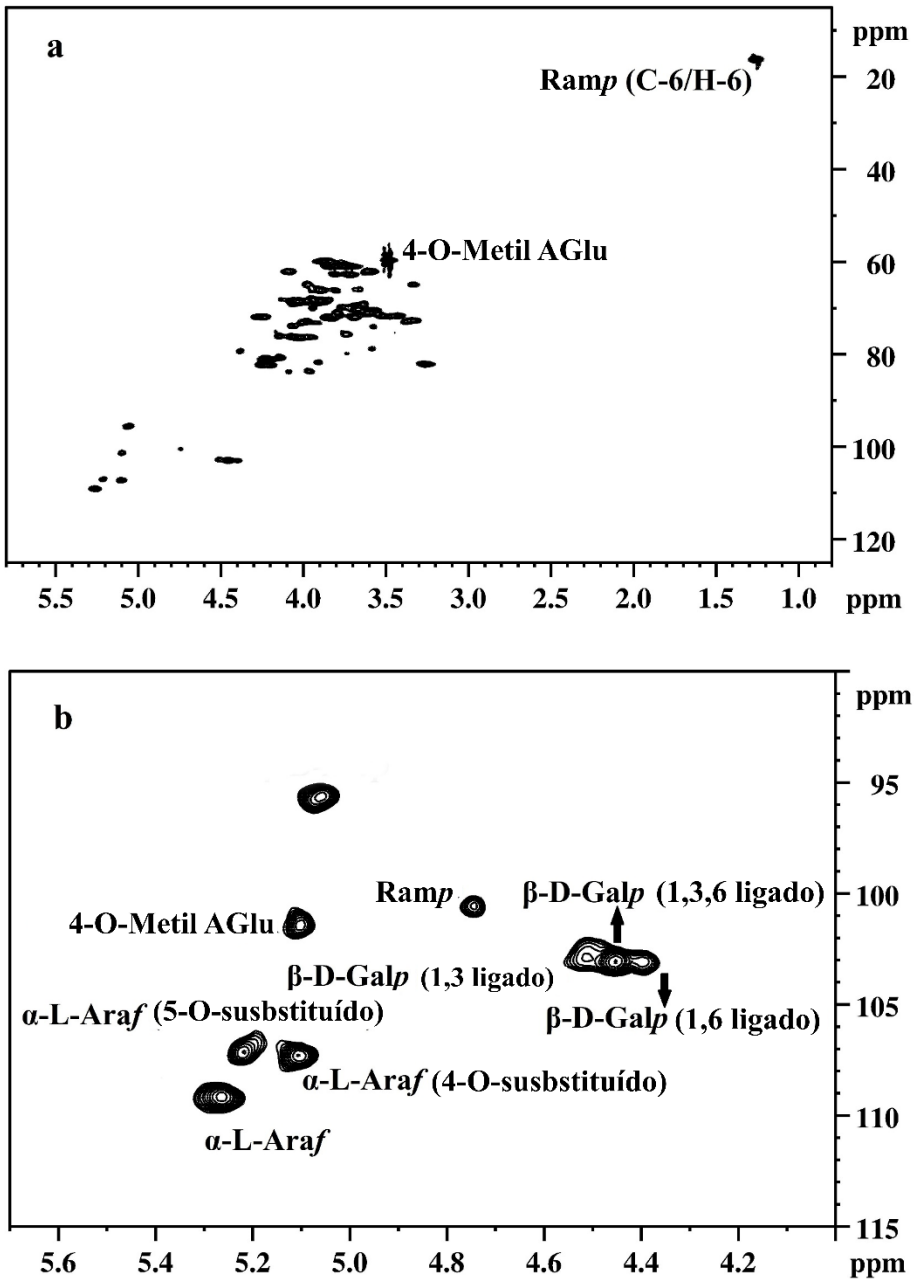


Figura 5. Espectro de RMN de HSQC de $^{1}H/^{13}C$ da GL em D_2O (A) espectro completo; (B) espectros da região anomérica.

A expansão da região anomérica (figura 5B) mostra 9 correlações. C-1/H-1 foram atribuídos como α-L-arabinofuranose não redutora (α-L-Ara*f*) (δ109,1/5,26); α-L-Ara*f* 5-O-substituído (δ107,1/5,21); α-L-Ara*f* 2-O-substituído (δ107,2/5,10); galactopiranose (β-

$_D$-Gal*p*) (ligado 1,3) em δ102,9/4,52; β-$_D$-Gal*p* (ligado 1,6) em δ103,1/4,40 e β-$_D$-Gal*p* (ligado 1,3,6) em δ103,7/4,45. As correlações C-1 H-1 do ácido 4-OMe-α-$_D$-glucurônico (4-OMe-Glc*p*A) e ramnopiranose (Ram*p*) (Rodriguez-Carvajal *et al*., 2003) são mostradas em δ101,4/5,09 e δ100,4/4,74; O resíduo α-$_L$-arabinopiranose mostra (correlação C-1/H-1 em δ95,5/5,05 (Arata *et al*., 2016). A figura 6 mostra um padrão estrutural de carboidrato obtido por análise estrutural e proposto por Stoddart e Jones (1968), com β-$_D$-galactopiranose (β-$_D$-Gal*p*) ligada (1→3) e (1→6) como cadeia principal e β-$_D$-Gal*p* (1→6), L-arabinopiranose, L-arabinofuranose, L-ramnopiranose e 4-O-metil-glucurônico como ramificações (figura 6).

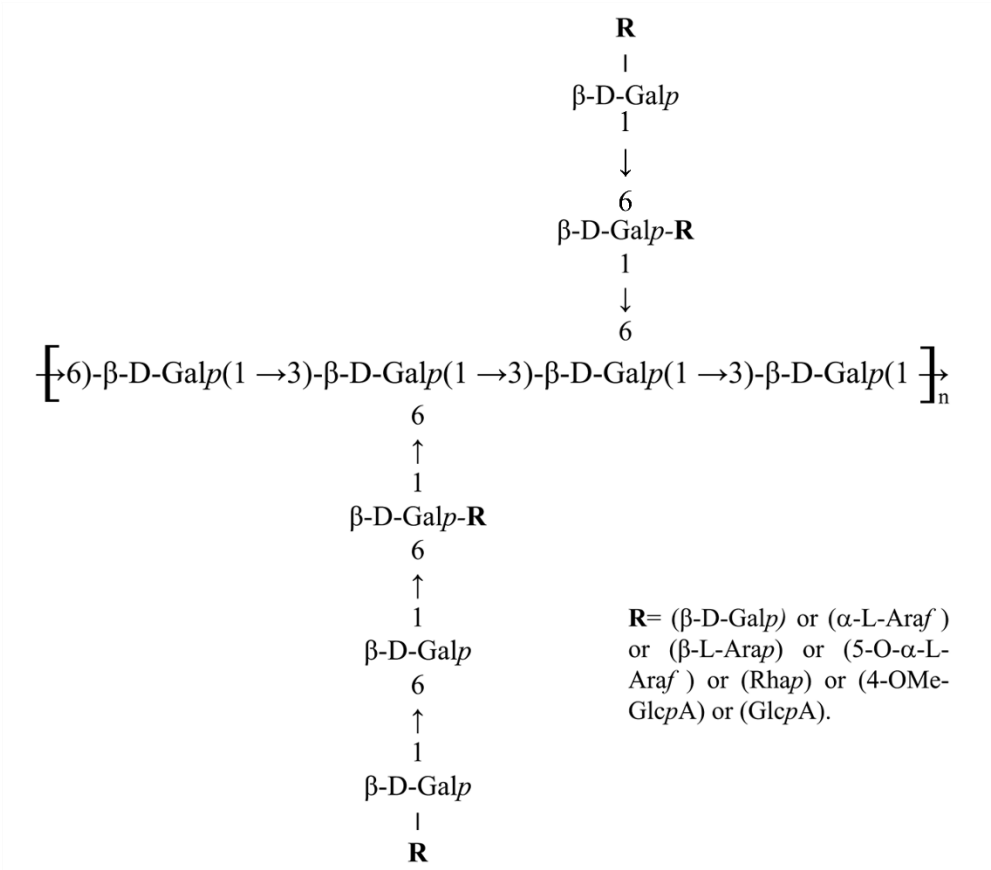


Figura 6. Padrão estrutural da GL obtido por análise estrutural.

A proporção de unidades principais foi calculada com base no espectro integrado de HSQC-RMN na região anomérica (Tovar *et al.*, 2016; Chagas *et al*., 2020; Pereira Júnior *et al*., 2021). A proporção de arabinose: galactose: ramnose:4-OMe-ácido glucurônico foi de 1:0,65:0,06:0,15 (Tabela 1). A proporção de açúcares é diferente do relatado anteriormente (Stoddart; Jones, 1968). No entanto, os mesmos tipos de

monossacarídeos estão presentes em quantidades aproximadamente semelhantes. Embora a proporção de açúcares ácidos tenha sido menor aqui (8% vs 23%). As análises de CLAE de açúcar neutro após hidrólise mostrou uma proporção de: 1:0,67:0,09 (Tabela 1), para arabinose:galactose:ramnose, corroborando com a composição obtida por RMN. A integração de sinais anoméricos de $^{1}H/^{13}C$ permitiu o cálculo de diferentes resíduos de ligação na GL: D-galactose (1,3,6 ligado) 24,4%; D-galactose (ligada 1,3) 6,8%; D-galactose (ligada 1,6) 3,7%; resíduo de α-L-arabinopiranose 15,0%; α-L-arabinofuranose não redutora, 17,5%; α-L-arabinofuranose substituída em 5-O, 12,7%; α-L-arabinofuranose substituída em 2-O, 8,4% e ácido 4-OMe-β-D-glucurônico 8,2%.

Tabela 1. Composição monossacarídca da GL por CLAE (açucar neutro) e RMN (integração dos anômericos).

Monossacarídeos	CLAE (%)	RMN (%)
Arabinose	56,8	53.6
Galactose	38,06	34.9
Ácido 4-O-metil glucurônico	-	8.2
Ramnose	5,11	3.3

3.2 Teste de citotoxicidade *in vitro*

O ensaio MTT demonstrou que a GL na concentração de 500 µg/mL não apresentou grande inibição na proliferação das linhagens celulares: HCT-116 (7,00%), SNB-19 (38,87%) e L929 (13,99%) (figura 7). Entretanto, a porcentagem de inibição do crescimento celular foi quase ou superior a 50% contra PC-3 (58,84%), HL-60 (49,92%) e B16-F10 (51,65%), destacando a porcentagem de inibição observada para a linhagem PC-3.

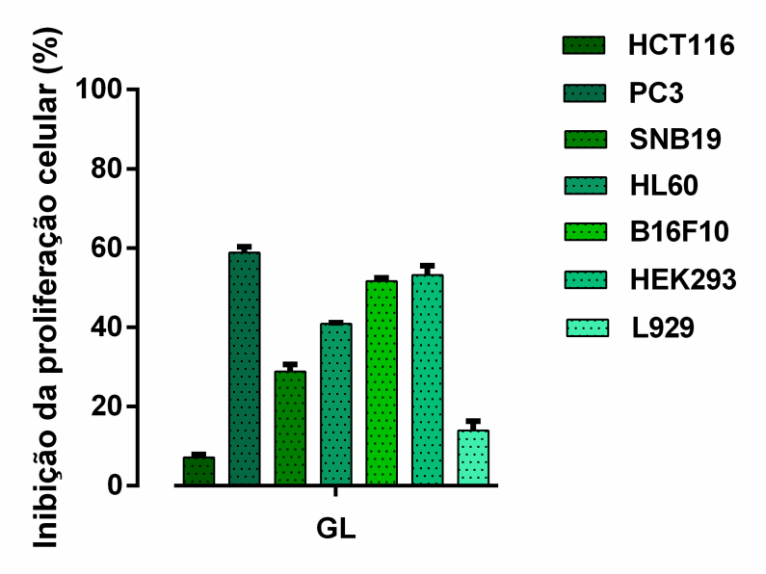


Figura 7. Inibição da proliferação celular (%) de GL em diferentes linhagens de células tumorais HCT-116 (carcinoma de cólon), PC-3 (próstata), SNB19 (astrocitoma), HL60 (leucemia), B16F10 (melonoma) e L929 (fibroblasto murino).

Estudos anteriores demonstraram que polissacarídeos isolado de *Ficus pandurata* (LV et al., 2020) e presentes em estacas de bambu (*Caulis bambusae*) (LI et al., 2019), apresentam atividade anticâncer. Além disso, a atividade biológica apresentada por esses polissacarídeos é influenciada por sua composição monossacarídica, peso molecular e fatores físico-químicos (Jia *et al*., 2016; Dammak *et al*., 2018). No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que GL apresentou maior atividade citotóxica, em ordem crescente, contra linhagens de células cancerígenas PC-3>HL-60>B16-F10.

Na avaliação morfológica das células PC-3 tratadas com GL na concentração referente à IC_{50} (120 µg/mL) obtida, foi possível observar alterações estruturais causadas após o tratamento. Todavia, o controle negativo apresenta células íntegras com formato fusiforme, com citoplasma e núcleo bem definidos (Figura 8A e 5B). As células tratadas apresentaram desorganização do conteúdo citoplasmático, levando à diminuição do seu formato fusiforme, com presença de picnose nuclear (setas azuis), vacuolização citoplasmática (setas amarelas) e corpos apoptóticos (Figura 8C e 5D).

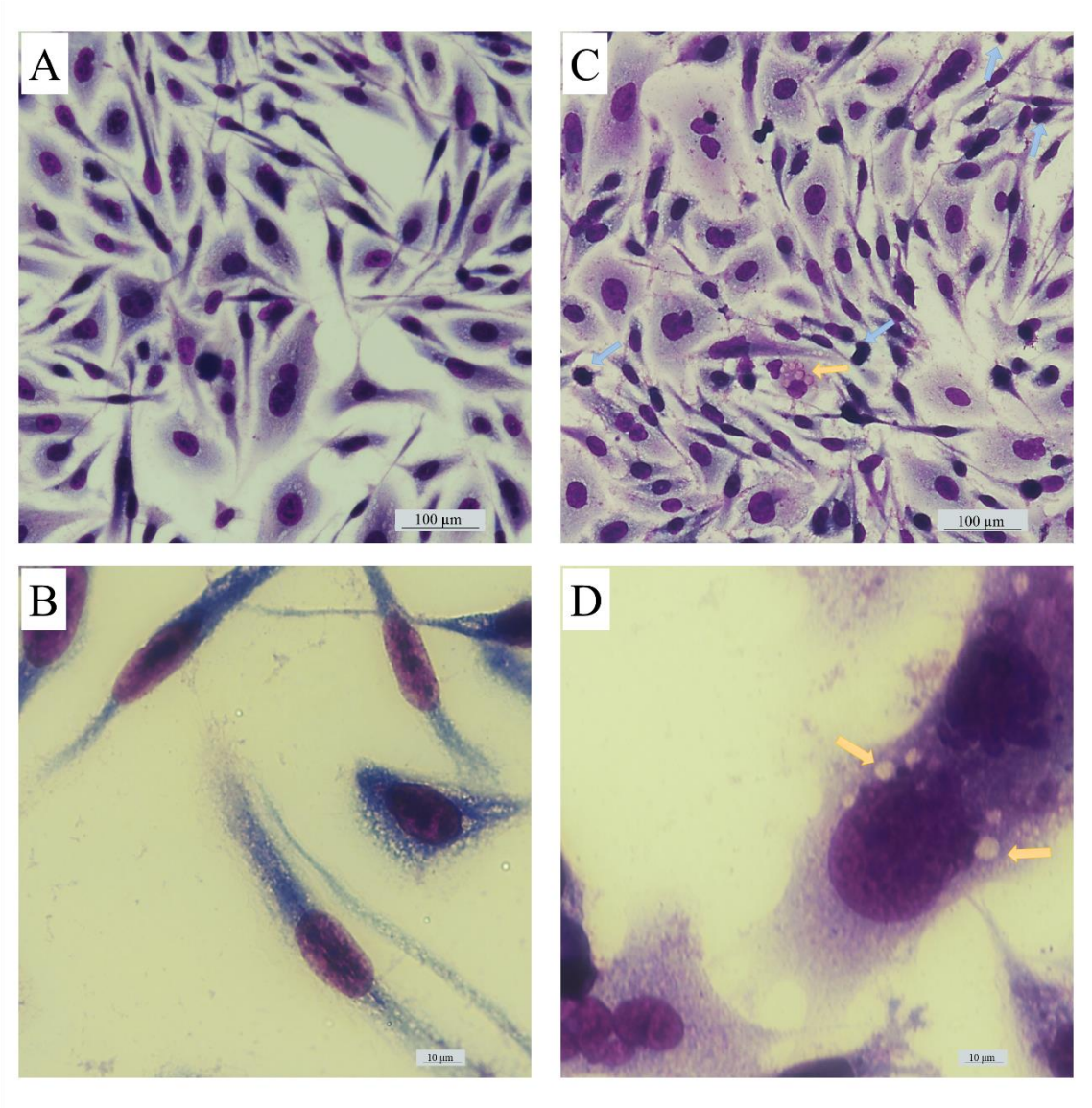


Figura 8. Análise morfológica da linhagem celular PC-3. Controle negativo (A e B), tratamento com GL (C e D). As setas azuis indicam picnose nuclear e as setas amarelas indicam vacúolos. (barra de escala: 100 µm em A e C; barra de escala: 10 µm em B e D).

Efeitos semelhantes foram observados para outros polissacarídeos contendo arabinogalactanas (Xie *et al*., 2013; Wei *et al*., 2019). Estudos relatam que alguns polissacarídeos exercem efeitos antiproliferativos em certas linhas de células cancerosas por indução de apoptose (Feng *et al*., 2019; Lin *et al*., 2019) ou por estimulação imunológica mediada por células (Li *et al*., 2020).

3.3 Teste de toxicidade *in vivo*

3.3.1 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella*

A sobrevivência das larvas tratadas com doses de 50, 25 e 10 mg/kg da GL foi semelhante ao controle (PBS) (figura 9). Esses resultados indicam que GL não apresentou toxicidade em *G. mellonella* nas condições testadas. Esse achado é positivo, considerando a grande correlação dos resultados obtidos entre o modelo de *G. mellonella* e células de mamíferos (Cutuli *et al*., 2019).

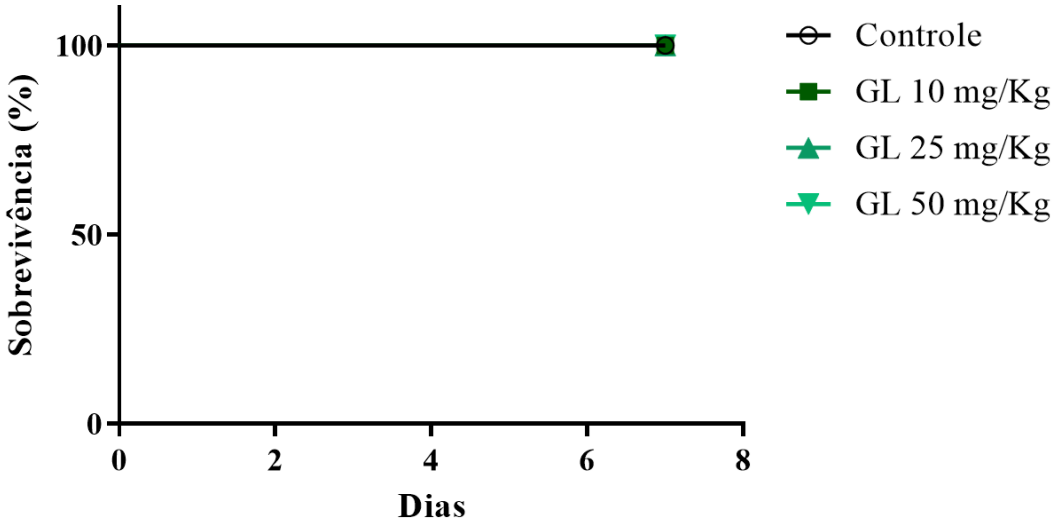


Figura 9. Curva de sobrevivência da toxicidade de GL em *G. mellonella*. Há uma sobreposição das curvas referentes ao controle e tratamento nas doses de 50, 25 e 10 mg/kg da GL no gráfico.

As larvas de *G. mellonella* têm sido amplamente utilizadas como modelo alternativo em ciências da saúde, incluindo a avaliação de toxicidade de compostos e testes de suscetibilidade a antibióticos. Este modelo tem várias vantagens, como baixo custo de manutenção, fácil manejo, capacidade de sobreviver em diferentes temperaturas, incluindo temperatura fisiológica de mamíferos, similaridade da resposta imune à resposta imune inata de mamíferos e nenhuma exigência de aprovação ética para uso (Champion; Wagley; Titball, 2016; Mccloskey *et al*., 2019).

3.3.2 Avaliação da Triagem Hipocrática

Os resultados demonstraram que não houve diferença nos animais que receberam GL (2000 mg/kg) em comparação aos indivíduos do grupo controle (tabela 2). Portanto,

não houve observação de efeitos tóxicos nas atividades motoras ou indícios de perturbação sensorial, os animais permaneceram sem sinais de toxicidade até o dia da eutanásia. A literatura relata que outros derivados de *Citrus*, como óleos essenciais, suco e extrato hidroalcoólico, também apresentam efeitos terapêuticos e são considerados seguros em termos de toxicidade. Esses dados enfatizam que a maior dose permitida é suficiente e segura para a saúde animal (Arbo *et al*., 2008; Vijaya; Ch; Ravishanker, 2014; Bouzenna *et al*., 2016; Ammad *et al*., 2018; Dosoky *et al*., 2018; Guo *et al*., 2018; Ekawati; Darmanto, 2019).

Tabela 2. Triagem hipocrática: parâmetros fornecidos após administração oral em dose única de 2.000 mg/kg da GL em camundongos machos. O controle (SAL) recebeu apenas solução salina 0,9% por gavagem. Escores: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente (BRITO, 1994). Os resultados são expressos em média aritmética.

	Parâmetros	Grupos (n = 5)	Tempo (h)					Tempo (dias)			
			0,25	0,5	1	2	24	3	7	10	14
Estado Consciente e Disposição	Atividade Geral	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Atividade e Coordenação Sistema Motor e Tônus Muscular	Resposta ao toque	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	3	3
	Pegada de cauda	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	3	3
	Alisamento	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Tônus corporal	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Força de agarrar	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Reflexões	Reflexo corneano	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sistema nervoso central (NSC)	Tremores	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsões	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Contorção	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Straub	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema nervoso autônomo (NSA)	Lacrimejamento	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Piloereção	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Respiração	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Constipação intestinal	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalidade		SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GL	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3.3 Análise da massa corporal dos animais após o período de tratamento e da massa média dos órgãos

Foram monitorados a perda e o ganho de massa dos animais, bem como a massa dos órgãos (baço, fígado, intestino delgado, coração e rins). De acordo com a Tabela 3, não houve diferença estatística entre o peso dos órgãos avaliados, quando comparados o grupo salina e os animais que receberam GL. Dessa forma, os resultados observados na Tabela 2 são semelhantes aos encontrados por Tarkang et al. (2012) ao avaliar os extratos etanólico e aquoso de *Citrus sinensis*. Outra variação, os extratos de *Citrus aurantium*, na dose de 5000 mg/kg, não foram capazes de induzir efeitos tóxicos (Deshmukh *et al*., 2017).

Tabela 3. Ação da GL no ganho de massa corporal (g) e na massa média dos órgãos (%) em camundongos fêmeas. Valores apresentados como média ± EPM.

Grupo	Dose (mg/kg)	Massa corporal (g)		Massa média do órgão (%)				
		Antes	Depois	Fígado	Coração	Baço	Rins	Intestino delgado
SAL	2,5	28,00± 0,82	32,00± 0,0	27,50 ±0,50	27,50±0, 49	27,50 ±0,50	27,50±0,5 0	27,50±0,5 0
GL	2000	31,00± 0,99	35,50± 1,7	30,50 ±1,30	30,52±1, 25	30,50 ±1,26	30,50±1,2 6	30,50±1,2 6

- Os dados do GL não mostraram diferença estatística em relação ao grupo controle.

3.3.4 Avaliação da ingestão de alimentos e água, excreção e aparência fecal

Esses índices são integrados na análise toxicológica como informação preliminar. Alterações no apetite e na motilidade intestinal indicam fortemente a ausência de biocompatibilidade, levando à modulação negativa do sistema imunológico e ocasionalmente predispondo os animais a infecções. Essas alterações podem incluir anorexia, diarreia, constipação, adipsia e polidipsia (Dion; Chappuis; Ripoll, 2016).

Os animais tratados com GL não apresentaram essas características. As quantidades de ração e água, bem como a quantidade e aparência das fezes, foram

monitoradas. Esses resultados estão demonstrados na Tabela 4. Os resultados confirmaram ausência de sintomas clínicos relacionados à incompatibilidade sistêmica. Portanto, de acordo com esses parâmetros, o produto é considerado não tóxico (Li *et al.*, 2019; Qin *et al*., 2009; Adeniyi *et al*., 2017).

Tabela 4. Médias dos valores obtidos no consumo de água e ração, produção de excretas e aspecto fecal analisados durante 14 dias, em camundongos machos, tratados com solução salina 0,9% e goma de limão. Os dados são apresentados como média ± SEM. As pontuações para aspecto fecal foram estratificadas usando o método de Dicarlo et al. (1994). Fezes normais = 0, fezes semissólidas = 1, fezes pastosas em pequenas/moderadas quantidades = 2, fezes aquosas em grandes quantidades = 3.

Tratamento	Dose	Consumo de água (mL/dia)	Consumo de ração (g/dia)	Produção de excretas (g/dia)	Produção de urina (mL/dia)	Aspecto Fecal (0-3)
Controle	2,5 (ml/kg)	37,46 ± 1,39	24,92 ± 1,42	11,80 ± 0,29	9,770 ± 0,99	0
GL	2.000 (mg/kg)	37,69 ± 2,47	27,23 ± 0,92	11,00 ± 0,26	7,668 ± 1,26	0

- Os dados do GL não mostraram diferença estatística em relação ao grupo controle.

3.3.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e do plasma

Os resultados hematológicos e bioquímicos (Tabela 5) apresentaram valores normais. Em relação à análise hematológica, os valores da contagem total de eritrócitos e leucócitos, bem como dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) não apresentaram alterações. Para a contagem diferencial relativa e absoluta de leucócitos não foram observadas alterações nesses parâmetros, que se mantiveram estáveis entre os grupos tratados com a GL e o grupo controle, que recebeu apenas solução salina (0,9%). Esses dados sugerem que a goma de limão não afeta a hemostasia (Bandeira *et al*., 2014; Adokoh *et al*., 2019).

Tabela 5. Análises hematológicas e bioquímicas do sangue e plasma (respectivamente) após administração oral de GL em camundongos fêmeas, após 14 dias consecutivos. Os valores são apresentados como média ± EPM.

	Parâmetros	Controle (2,5 ml/kg)	GL (2.000 mg/kg, v.o.)
Hematológicos	Eritrócitos (milhões/mm^3)	7,960 ± 1,85	8,186 ± 0,58
	Hemoglobina (g/dL)	15,58 ± 0,56	15,48 ± 0,21
	Hematócrito (%)	46,75 ± 1,65	48,25 ± 1,25
	VCM (fL)	84,10 ± 37,06	59,54 ± 2,87
	HCM (pg)	27,82 ± 12,10	19,26 ± 1,59
	CHCM (g/dL)	33,37 ± 1,032	32,17 ± 1,17
	Leucócitos milhares/mm^3	7075 ± 337,0	7600 ± 277,6
	Segmentados (%)	13,00 ± 1,08	18,50 ± 2,87
	Monócitos (%)	5,000 ± 0,41	2,750 ± 0,48
	Linfócitos (%)	81,75 ± 1,65	78,75 ± 3,33
	Eosinófilos (%)	0,2500 ± 0,25	0,0 ± 0,0
	Plaquetas milhares/µL	516,1 ± 36,41	563,6 ± 27,11
Função Renal	UREIA (mg/dL)	51,92 ± 3,35	60,09 ± 3,61
	CREATININA (mg/dL)	0,6275 ± 0,04029	0,6275 ± 0,02658
Função hepática	AST-TGO (U/ml)	0,2259 ± 3,762e-005	0,2259 ± 3,748e-005
	ALT-TGP (U/ml)	0,2897 ± 6,242e-005	0,2897 ± 2,734e-005

- Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).

Marcadores bioquímicos relacionados aos órgãos responsáveis pelo metabolismo e excreção de xenobióticos também foram investigados, pois indicam possíveis alterações

na função renal (creatinina e ureia) e hepática (AST e ALT). Em relação a esses marcadores não foram observadas alterações significativas entre os grupos. Os resultados estão demonstrados na tabela 5 e podem ser corroborados com os resultados relatados para toxicidade aguda da goma angico, relatados por Araújo et al. (2020). Assim, com base na análise da função renal e hepática, a GL pode ser considerada segura.

3.3.5 Avaliação histológica dos órgãos

Em relação à análise histológica, nenhuma evidência de toxicidade foi observada. Na seção histológica do baço, tanto o grupo controle (figura 10A) quanto o grupo tratado (figura 10B) apresentaram arquitetura usual: polpa vermelha e cápsula de tecido conjuntivo, representadas por setas (preta e vermelha, respectivamente).

A seção hepática dos animais tratados com a GL (figura 10D) mostrou veia central e hepatócitos sem quaisquer alterações histológicas em comparação ao controle (figura 10C). A análise do rim tratado com a GL (figura 10F) mostrou glomérulo normal, com um espaço de Bowman bem definido e tubos contorcidos distais e proximais bem regulados. Essas características foram semelhantes ao grupo controle (figura 10E).

As figura 10G e 10H representam a seção cardíaca do grupo controle e do grupo tratado, respectivamente. Ambas as imagens mostram tecido cardíaco normal, sem necrose, fibrose ou infiltração de neutrófilos, portanto, nenhuma evidência de inflamação foi observada. Além disso, as setas demonstram uma conformação regular das fibras musculares. O tecido intestinal cortado em ambos os grupos (figura 10I e 10I) exibe vilosidades e mucosa intestinal típica, sem infiltrado neutrofílico e ausência de necrose. As setas também indicam tecido epitelial normal com presença de células caliciformes, típicas do tecido intestinal. Resultados semelhantes foram observados para goma de cajueiro (Araújo *et al*., 2015; Carvalho *et al*., 2015) e goma angico (Araújo *et al*., 2020).

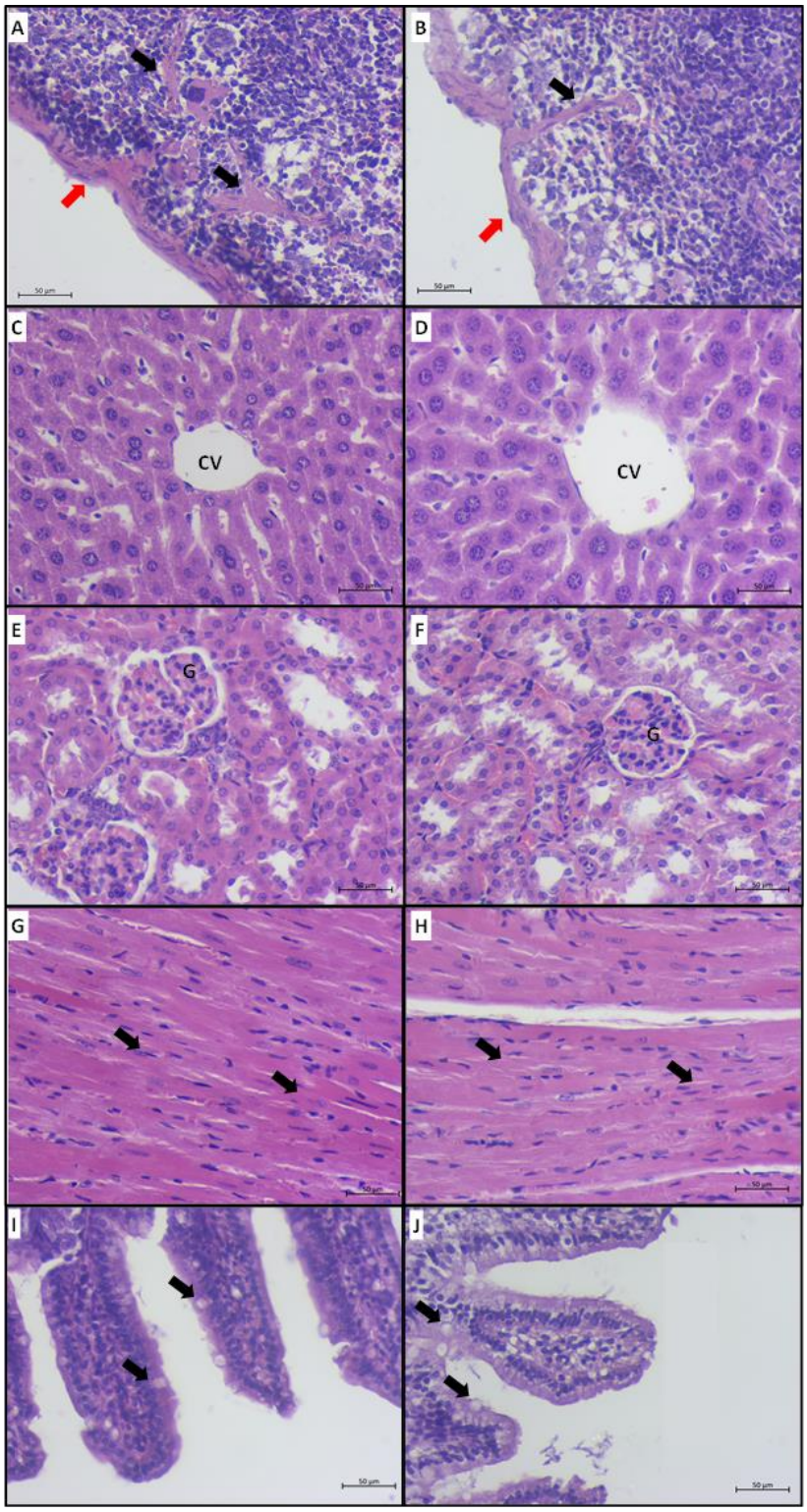


Figura 10. Histopatologia do Baço: A) grupo salina e (B) grupo GL, ambos apresentando arquitetura habitual, trabéculas de tecido conjuntivo (seta preta) e cápsula (seta vermelha); C e D Tecido Hepático: (C) Salina e (D) GL, não apresentaram alterações histológicas, principalmente a veia central com sua conformação usual (VC). E e F Córtex Renal: (E) Salina e (F) GL, ambos apresentando glóbulo com glomérulo típico (G) e espaço capsular normal circundado por cápsula de Bowman. G e H Histopatologia

Cardíaca: (G) Salina e (H) GL apresentando tecido muscular cardíaco normal, sem presença de infiltrado inflamatório, necrose e dano hemorrágico (seta preta mostrando conformações normais das fibras musculares). I e J Histopatologia do intestino: (I) Salina e (J) GL mostrando arquitetura usual, ilustrando mucosa típica, sem necrose, sem infiltração de neutrófilos e características normais de células epiteliais (seta preta: células caliciformes). Coloração de hematoxilina e eosina A-J.

4. CONCLUSÃO

O GL é composto principalmente de arabinose e galactose com menor proporção de ácido 4-O-metil glucurônico e ramnose. O polímero apresentou perfil de arabinogalactana, com pequenos traços de proteína, destacando a pureza do isolado. Além disso, a composição neste estudo foi obtida por RMN e CLAE, usando GL não hidrolisado e hidrolisado. Assim, enfatizando a importância de novos estudos que adicionem informações sobre a composição e estrutura do GL de diferentes perspectivas. A atividade citotóxica do GL contra linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas indicou que o tratamento de células com GL exibiu maior porcentagem de inibição para PC-3, linhagem de adenocarcinoma de próstata humano. As células tratadas apresentaram desorganização do conteúdo citoplasmático, com características apoptóticas. Os modelos in vivo utilizados demonstraram que o GL não apresenta toxicidade, comprovando evidências de que é um polímero biocompatível. Esses achados seguem as diretrizes apresentadas no guia 423 da OCDE, sendo classificado na categoria 5 (não tóxico) pelo GHS. Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o GL pode ser um polímero promissor para aplicações biomédicas e biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

Adeniyi, O. S., Omale, J., Omeje, S. C., & Edino, V. O. (2017). Antidiarrheal activity of hexane extract of Citrus limon peel in an experimental animal model. *J. Int. Med.*, *15*(2), 158-164.

Adokoh, C. K., Asante, D. B., Acheampong, D. O., Kotsuchibashi, Y., Armah, F. A., Sirikyi, I. H., Kimura, K., Gmakame, E. & Abdul-Rauf, S. (2019). Chemical profile and in vivo toxicity evaluation of unripe Citrus aurantifolia essential oil. *Tox. Rep.*, *6*, 692-702.

Alarcón, R., Pardo-de-Santayana, M., Priestley, C., Morales, R., & Heinrich, M. (2015). Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *J. Ethno., 176*, 207-224.

Alves, E. H. P., Carvalho, A. D. S., Silva, F. R. P., Carvalho França, L. F., Di Lenardo, D., Vasconcelos, A. C. C. G., Nascimento, H. M. S., Lopes, V. L. R., Oliveira, J. S., & Vasconcelos, D. F. P. (2020). Bromelain reduces the non-alcoholic fatty liver disease and periodontal damages caused by ligature-induced periodontitis. *Oral Dis*.

Ammad, F., Moumen, O., Gasem, A., Othmane, S., Hisashi, K. N., Zebib, B., & Merah, O. (2018). The potency of lemon (Citrus limon L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. *C. Ren. Biol., 341*(2), 97-101.

Anderson, E., Russell, F.H. & Seigle, L.W. (1936). Gum from lemon trees. *J. Bio. Chem.*, 113, 683-690.

Andrews, P. & Jones, J.K. N. (1955). The isolation of oligosaccharides from gums and mucilages .4. The isolation of 3-0-beta-L-arabopyranosyl-L-arabinose from lemon gum. *J. Chem. Soc.*, 583-584.

Arata, P. X., Quintana, I., Raffo, M. P., & Ciancia, M. (2016). Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed Cladophora falklandica: Chemical structure and action on the fibrin network. *Carb. Pol., 154*, 139-150.

Araújo, T. S., Costa, D. S., Sousa, N. A., Souza, L. K., de Araújo, S., Oliveira, A. P., Sousa, F. B. M., Silva, D. A., Barbosa, A. L.R., Leite, J. R. S.A. & Medeiros, J. V. R. (2015). Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of Anacardium occidentale L. in rodents. *J. Ethno.,174*, 299-307.

Araújo, T.S.L.; de Oliveira, T.M.; de Sousa, N.A.; Souza, L.K.M.; Sousa, F.B.M.; de Oliveira, A.P.; Nicolau, L.A.D.; da Silva, A.A.V.; Araújo, A.R.; Magalhães, P.J.C.; Vasconcelos, D.F.P.; de Jonge, H.R.; Souza, M.H.L.P.; Silva, D.A.; Paula, R.C.M.; Medeiros, J.V.R. (2020). Biopolymer extracted from *anadenanthera colubrina* (Red

angico gum) exerts therapeutic potential in mice: antidiarrheal activity and safety assessment. *Pharmaceuticals*, *13*(1), 17.

Arbo, M. D., Larentis, E. R., Linck, V. M., Aboy, A. L., Pimentel, A. L., Henriques, A. T., Dallegrave, E. , Garcia, S.C. , Leal, M.B. & Limberger, R. P. (2008). Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of Citrus aurantium extract and p-synephrine. *F. Chem. Tox.*, *46*(8), 2770-2775.

Arias, B. A., & Ramón-Laca, L. (2005). Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *J. Ethno.*, *97*(1), 89-95.

Azero, E. G., & Andrade, C. T. (2002). Testing procedures for galactomannan purification. *Pol. Test.*, *21*(5), 551-556.

Balasubramanian, S., Skaf, J., Holzgrabe, U., Bharti, R., Förstner, K. U., Ziebuhr, W., Humeida, U. H., Abdelmohsen, U. R., & Oelschlaeger, T. A. (2018). A new bioactive compound from the marine sponge-derived Streptomyces sp. SBT348 inhibits Staphylococcal growth and biofilm formation. *Front. Micro.*, *9*, 1473.

Bandeira, R., Magalhães, A. F., & de Aquino, H. B. D. S. (2014). < b> Interpretação dos Critérios de Liberação dos Resultados de Hemograma Através de Contadores Automatizados em Laboratório de Urgência/Interpretation of Criteria for the Release of Blood Tests Results by Automatic Counters in Urgency Laboratories. *S. Pes.*, ISSN 2176-9206, 7(3).

Bouzenna, H., Dhibi, S., Samout, N., Rjeibi, I., Talarmin, H., Elfeki, A., & Hfaiedh, N. (2016). The protective effect of Citrus limon essential oil on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by aspirin in rats. *Biom. & Pharm.*, *y*, *83*, 1327-1334.

Brito, A. S. (1994). Manual de ensaios toxicológicos in vivo. In *Manual de ensaios toxicológicos in vivo* (pp. 122-122).

Caetano, N. L. B., Ferreira, T. F., Reis, M. R. O., Neo, G. G. A., & Carvalho, A. A. (2015). Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Lagarto-SE, Brasil–ênfase em pacientes oncológicos. *Rev. Bras. Plan. Med.*, *17*(4), 748-756.

Carvalho, N. S., Silva, M. M., Silva, R. O., Nicolau, L. A., Sousa, F. B. M., Damasceno, S. R., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R., Leite, J. R. S. A. & Medeiros, J. V. R. (2015). Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of Anacardium occidentale, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Drug. Devel. Res.*, *76*(3), 143-151.

Chagas, F. D. S., Lima, G. C., dos Santos, V. I. N., Costa, L. E. C., de Sousa, W. M., Sombra, V. G., Araújo, D. F., Barros, F. C. N., Marinho-Soriano, E., Feitosa, J. P. A., de Paula, R. C. M., Pereira, M. G., & Freitas, A. L. P. (2020). Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. *I. J. Bio. Mac.*

Champion, O. L., Wagley, S., & Titball, R. W. (2016). Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*, *7*(7), 840-845.

Connell, J.J; Hainsworth, R. M.; Hirst, E.L. & Jones, J.K.N. (1950). Grapefruit and lemon gums .1. The ration of sugars present in the gums and the structure of the aldobionic acid (4-D-glucuronosido-D-galactose) isolated by graded hydrolysis of the polysaccharides *J. Chem. Soc.*, 1696-1700.

Cutuli, M. A., Petronio Petronio, G., Vergalito, F., Magnifico, I., Pietrangelo, L., Venditti, N., & Di Marco, R. (2019). Galleria mellonella as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*, *10*(1), 527-541.

Da Silva, B. J. M., Hage, A. A. P., Silva, E. O., & Rodrigues, A. P. D. (2018). Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. *J. Integ. Med.*, *16*(4), 211-222.

Dammak, M. I., Chakroun, I., Mzoughi, Z., Amamou, S., Mansour, H. B., Le Cerf, D., & Majdoub, H. (2018). Characterization of polysaccharides from Prunus amygdalus peels: Antioxidant and antiproliferative activities. *I. J. Bio. Mac.*, *119*, 198-206.

De Paula, R. C. M., & Rodrigues, J. F. (1995). Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from Anacardium occidentale L. *Carb Pol.*, *26*(3), 177-181.

Deshmukh, N. S., Stohs, S. J., Magar, C. C., & Kadam, S. B. (2017). Citrus aurantium (bitter orange) extract: Safety assessment by acute and 14-day oral toxicity studies in rats and the Ames Test for mutagenicity. *Reg. Tox. Pharm.*, *90*, 318-327.

Dion, C., Chappuis, E., & Ripoll, C. (2016). Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nut. & Met.*, *13*(1), 1-11.

Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils. *I. J. Mol. Scie.*, *19*(7), 1966.

Ekawati, E. R., & Darmanto, W. (2019). Lemon (citrus limon) juice has antibacterial potential against diarrhea-causing pathogen. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 217, No. 1, p. 012023). IOP Publishing.

Esakkimuthu, S., Mutheeswaran, S., Arvinth, S., Paulraj, M. G., Pandikumar, P., & Ignacimuthu, S. (2016). Quantitative ethnomedicinal survey of medicinal plants given for cardiometabolic diseases by the non-institutionally trained siddha practitioners of Tiruvallur district, Tamil Nadu, India. *J. Ethno.*, *186*, 329-342.

Feng, Y. Y., Ji, H. Y., Dong, X. D., Yu, J., & Liu, A. J. (2019). Polysaccharide extracted from Atractylodes macrocephala Koidz (PAMK) induce apoptosis in transplanted H22 cells in mice. *I. J. Bio. Mac.*, *137*, 604-611.

Gachet, M. S., Lecaro, J. S., Kaiser, M., Brun, R., Navarrete, H., Muñoz, R. A., Bauer, R., Schühly, W. (2010). Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *J. Ethno.*, *128*(1), 184-197.

Guo, J. J., Gao, Z. P., Xia, J. L., Ritenour, M. A., Li, G. Y., & Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *Lwt*, *97*, 825-839.

Jia, X., Ma, L., Li, P., Chen, M., & He, C. (2016). Prospects of Poria cocos polysaccharides: Isolation process, structural features and bioactivities. *T. F. Scie. & Tech.*, *54*, 52-62.

Kffuri, C. W., Lopes, M. A., Ming, L. C., Odonne, G., & Kinupp, V. F. (2016). Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. *J. Ethno.*, *178*, 188-198.

Khan, H., Jawad, M., Kamal, M. A., Baldi, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2018). Evidence and prospective of plant derived flavonoids as antiplatelet agents: Strong candidates to be drugs of future. *F. Chem. Tox.*, *119*, 355-367.

Li, G., Zhang, Y., Xie, E., Yang, X., Wang, H., Wang, X., Li, W., Song, Z., Mu, Q., Zhan, W., Wu, Q., Huang, J., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, F. & Wu, Q. (2019). Functional characterization of a potent anti-tumor polysaccharide in a mouse model of gastric cancer. *Life scie.*, *219*, 11-19.

Li, J. M., & Nie, S. P. (2016). The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *F. Hydro.*, 53, 46-61.

Li, W., Hu, X., Wang, S., Jiao, Z., Sun, T., Liu, T., & Song, K. (2020). Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation. *I. J. Bio. Mac.*, *145*, 985-997.

Lin, L., Cheng, K., Xie, Z., Chen, C., Chen, L., Huang, Y., & Liang, Z. (2019). Purification and characterization a polysaccharide from Hedyotis diffusa and its apoptosis inducing activity toward human lung cancer cell line A549. *I. J. Bio. Mac.*, *122*, 64-71.

Liyanage, S., Abidi, N., Auld, D., & Moussa, H. (2015). Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (Cyamopsis tetragonolobus L.). *I. Crops Prod.*, *74*, 388-396.

Lv, H., Hu, C., Xie, Z., Wang, P., Chen, X., & Wen, C. (2020). Purification, characterization and anti-tumor activity of a pectic-type polysaccharide isolated from Ficus pandurata H. *I. J. Bio. Mac.*

McCloskey, A. P., Lee, M., Megaw, J., McEvoy, J., Coulter, S. M., Pentlavalli, S., & Laverty, G. (2019). Investigating the In Vivo Antimicrobial Activity of a Self-Assembling Peptide Hydrogel Using a Galleria mellonella Infection Model. *ACS Omega*, *4*(2), 2584-2589.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immu. Met.*, *65*(1-2), 55-63.

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2002). *Test No. 423: Acute oral toxicity-Acute toxic class method*. OECD Publishing.

Passalacqua, N. G., Guarrera, P. M., & De Fine, G. (2007). Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*, *78*(1), 52-68. doi.org/10.1016/j.fitote.2006.07.005.

Pereira Júnior, L. C., Nascimento, F. G., Oliveira, S. R., Lima, G. C., Chagas, F. D. S., Sombra, V. G., Feitosa, J. P. A., Soriano, E. M., Souza, M. H. L. P., Zocolo, G. J., Silva, L. M. A., de Paula, R. C. M., Damasceno, R. O. S., & Freitas, A. L. P. (2021). Protective effect against gastric mucosa injury of a sulfated agaran from *Acanthophora spicifera*. *Carb. Pol.*, 261, 117829.

Posso, M. B. S., de Sant'Anna, A. L. G., de Araújo Giaretta, V. M., & Chagas, L. R. (2010). Terapêuticas não convencionais para o alívio da cefaleia. *Rev. dor*.

Qin, Y., Wu, X., Huang, W., Gong, G., Li, D., He, Y., & Zhao, Y. (2009). Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from Dioscorea zingiberensis CH Wright in rodents. *J. Ethno.*, *126*(3), 543-550.

Rodrıguez-Carvajal, M. A., du Penhoat, C. H., Mazeau, K., Doco, T., & Pérez, S. (2003). The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation. *Carb. Rese.*, *338*(7), 651-671.

Saha, A., Tyagi, S., Gupta, R. K., & Tyagi, Y. K. (2017). Natural gums of plant origin as edible coatings for food industry applications. *C. Rev. Biot.*, *37*(8), 959-973.

Silambarasan, R., & Ayyanar, M. (2015). An ethnobotanical study of medicinal plants in Palamalai region of Eastern Ghats, India. *J. Ethno.*, *172*, 162-178.

Stoddart, J. F. & Jones, J.K. N. (1968). Some structural features of Citrus limonia gum (lemon gum). *Carb. Res.*, 8 (1), 29-42.

Sznaider, F., Rojas, A. M., Stortz, C. A., & Navarro, D. A. (2020). Chemical structure and rheological studies of arabinoglucuronoxylans from the Cercidium praecox exudate brea gum. *Carb. Pol.*, *228*, 115388.

Tarkang, P. A., Agbor, G. A., Armelle, T. D., Tchokouaha, L. R. Y., Kemeta, D., & Ngadena, Y. S. M. (2012). Acute and sub-chronic toxicity studies of the aqueous and ethanolleaf extracts of Citrus sinensis (Linnaeus) Osbeck (pro sp.) in Wistar rats. *Der Pharm. Lett.*, *4*(5), 1619-1629.

Teixeira, D. M., Braga, R. C., Horta, A. C., Moreira, R. A., de Brito, A. C., Maciel, J. S., Feitosa, J. P. A. & De Paula, R. C. (2007). Spondias purpurea Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. *Carb. Pol.*, *70*(4), 369-377.

Tovar, A.M.F., Santos, G.R.C., Capillé, N.V., Piquet, A.A., Glauser, B.F., Pereira, M.S., Vilanova, E., Mourão, P.A.S. (2016). Structural and haemostatic features of

pharmaceutical heparins from different sources: challenges to define thresholds separating distinct drugs. *Scie. Repor.*, *6*, 35619.

Vijaya, S., CH, A. K., & Ravishanker, D. (2014). Citrus gum matrix tablets for sustain release of aceclofenac: in vitro drug release and swelling behavior. *A. J. Phar. Clin. Res.*, v. 7, n. 4, p. 68–73.

Wei, C., Zhang, Y., He, L., Cheng, J., Li, J., Tao, W., Maoa, G., Zhanga, H., Linhardt, R. J., Ye, X. & Chen, S. (2019). Structural characterization and anti-proliferative activities of partially degraded polysaccharides from peach gum. *Carb. Pol.*, *203*, 193-202.

Xie, J. H., Liu, X., Shen, M. Y., Nie, S. P., Zhang, H., Li, C., Gong, D. M. & Xie, M. Y. (2013). Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from Cyclocarya paliurus leaves. *F. Chem.*, *136*(3-4), 1453-1460.

Zhao, J., Zhang, F., Liu, X., Ange, K. S., Zhang, A., Li, Q., & Linhardt, R. J. (2017). Isolation of a lectin binding rhamnogalacturonan-I containing pectic polysaccharide from pumpkin. *Carb. Pol.*, *163*, 330-336.

CAPÍTULO 2
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTRUTURAL E PERFIL TOXICOLÓGICO DA GOMA DO SERIGUELEIRO EXTRAÍDA DO EXSUDATO DA *Spondias purpurea*

RESUMO

O estudo tem como objetivo isolar e caracterizar a goma do serigueleiro (GS) do Parnaíba-PI, Brasil. Após o isolamento da GS, foi realizada a hidrólise ácida e a composição de monossacarídeos. A goma foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN). A massa molar da GS foi determinada por cromatografia de exclusão de tamanho. O teor de proteína foi medido por análise elementar (%N). Além disso, foram analisados o potencial Zeta, ácidos urônicos, viscosidade, análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial, bem como difração de raios X da GS. A toxicidade foi observada *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que a razão de monossacarídeos estabelecida foi de 1:0,55:0,05:0,04:0,03 para Gal:Ara:Gli:Man:Xil, respectivamente, indicando a presença de uma arabinogalactana de alta massa molar, com pequenos traços de proteína e potencial zeta negativo aumentado, possivelmente relacionada aos 16% de ácidos urônicos, bem como a ocorrência de ácidos glucurônico e 4-O-metil glucurônico evidenciados por RMN. As análises de TGA de GS demonstraram um perfil semicristalino amorfizado, com 3 eventos de degradação. Os resultados de toxicidade *in vitro* e *in vivo* demonstraram a biocompatibilidade de GS nos modelos testados. Portanto, nossos achados destacam o uso potencial de GS na indústria nutracêutica e em diferentes abordagens biotecnológicas, devido às suas características e perfil não tóxico.

PALAVRAS-CHAVE: *Spondias purpurea*, Arabinogalactana, Caracterização, Biocompatibilidade.

ABSTRACT

The study aims to isolate and characterize the seriguela tree gum (SG) from the Parnaíba-PI (Brazil). After isolating the SG, acid hydrolysis was performed, and the monosaccharide composition. The gum was characterized using infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR). The molar mass of SG was determined by size exclusion chromatography. Protein content was measured through elemental analysis (%N). Furthermore, the Zeta potential, uronic acids, viscosity, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry, as well as X-ray diffraction, of SG were analyzed. Toxicity was observed *in vitro* and *in vivo*. The results demonstrated that the established monosaccharide ratio was 1:0.55:0.05:0.04:0.03 for Gal:Ara:Gli:Man:Xyl, respectively, indicating the presence of an arabinogalactan of high molar mass, with small traces of protein, and increased negative zeta potential, possibly related to the 16% of uronic acids, as well as the occurrence of glucuronic and 4-O-methyl glucuronic acids evidenced by NMR. TGA analyses of SG demonstrated an amorphized semi-crystalline profile, with 3 degradation events. *In vitro* and *in vivo* toxicity results demonstrated SG biocompatibility in the tested models. Therefore, our findings highlight the potential use of SG in the nutraceutical industry and in different biotechnological approaches, due to its characteristics and non-toxic profile.

KEYWORDS: *Spondias purpurea*, Arabinogalactan, Characterization, Biocompatibility.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Spondias*, pertencente à família Anacardiaceae, mesma família do cajueiro, compreende cerca de 18 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, Ásia e Oceania. No Nordeste brasileiro, espécies significativas incluem *Spondias mombin* L. (cajazeira), *Spondias purpurea* L. (serigueleira), *Spondias cytherea* Sonn. (cajaraneira), *Spondias tuberosa* Arr. Câm. (umbuzeiro) e *Spondias* spp. (umbu-cajá e umbuguela). Essas árvores frutíferas são amplamente cultivadas na região. São plantas domesticadas capazes de produzir frutos do tipo drupa, que são frutos carnosos e de semente única (HOYOS, 1994; SOUZA, 1998; CEVA-ANTUNES et al., 2006; DA SILVA et al., 2014).

Estudos sobre *S. purpurea* L. envolveram a identificação de metabólitos presentes nas folhas (LEMOS et al., 1995), frutos (KOZIOŁ; MACÍA, 1998; AUGUSTO et al., 2000), polpas de frutos (CEVA-ANTUNES et al., 2006) e cascas (ENGELS et al., 2012). Além disso, propriedades antioxidantes e antiúlcera (DE ALMEIDA et al., 2017) dos extratos foram investigadas. O exsudato (figura 1A) secretado pela planta como mecanismo de proteção pode ser usado para isolar a goma, uma fração rica em polissacarídeos. A goma do serigueleiro (GS) tem uma composição química previamente relatada na literatura, que foi descrita preliminarmente por Pinto et. al. (1995) a partir do exsudato obtido de uma *S. purpurea* venezuelana. Sua composição inclui galactose, arabinose, manose, xilose, ramnose, unidades de ácido β-D-glicurônico e ácido 4-O-metil-α-glicurônico como resíduos terminais.

Texeira et. al. (2007) obtiveram resultados semelhantes ao isolar GS de uma árvore brasileira, sendo a diferença a quantidade de arabinose e ácidos presentes, bem como a presença de fucose e glicose. A cadeia principal foi composta por galactan-(1→3), substituída por unidades de -(1→6) D-galactose e D-xilose, L-arabinose, L-ramnose e ácido glucurônico. No entanto, não houve avanços quanto às propriedades físico-químicas e biológicas do GS, que são de grande importância para estudos futuros que explorem sua aplicabilidade. Portanto, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar o GS de plantas da região de Parnaíba-PI (Brasil), com foco em suas propriedades estruturais, físico-químicas e biológicas, incluindo toxicidade em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento da GS

O espécime de *S. purpurea* foi coletado, identificado e depositado no Herbário HDelta da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPar). Em seguida, foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob A1ED55E. O exsudato foi então coletado e a goma foi obtida de acordo com Teixeira et al. (2007). Onde, uma solução de 5% (p/v) do exsudato em água destilada foi preparada e deixada sob agitada por 24h. A solução foi filtrada e o pH foi ajustado para 7 com NaOH. Após, 2g de cloreto de sódio (NaCl) foram adicionados e agitados por 30 min. A goma foi precipitada usando etanol 99,5% na proporção de 3:1 (v/v) e deixada em repouso por 24h. A goma foi lavada com etanol e acetona, filtrada e seca sob corrente de ar quente.

2.2 Caracterização da GS

2.2.1 Hidrólise e cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG-MS)

A hidrólise da GS foi realizada usando ácido trifluoroacético (TFA). A amostra (10 mg) foi dissolvida em água (1 mL) e agitada por 24 h. Posteriormente, 1 mL de solução 4 mol L^{-1} de TFA foi adicionado e a mistura foi aquecida a 100 °C em um banho de glicerina em um recipiente de vidro selado por 6 h. A solução foi então lavada com metanol (5 vezes) e concentrada por evaporação em banho-maria a 80 °C. O material hidrolisado e os açúcares padrão foram ressuspensos em 3,0 mL de água destilada e reduzidos com $NaBH_4$ à temperatura ambiente com meio alcalino por 24 h sob agitação magnética. As resinas catiônicas foram adicionadas às soluções após 24 h e incubadas sob agitação magnética por aproximadamente 2 h. O ácido bórico produzido foi posteriormente coevaporado como borato de trimetila por lavagens sucessivas com metanol. Os alditóis obtidos após a redução foram acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v/v) à temperatura ambiente por 24h. A reação de acetilação foi interrompida pela adição de gelo, e os aditivos de acetato foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi removida por lavagens sucessivas com uma solução de $CuSO_4$ a 5%, seguida pela evaporação completa da fase orgânica (Wolfrom; Thompson, 1963).

A composição de açúcar neutro foi determinada por CG-MS usando um cromatógrafo a gás SHIMADZU GCMS-QP2010 SE com um autoinjetor AOC-5000. As condições de análise foram: injetor 250 °C, temperatura inicial de 60 °C permanecendo por 2 min, apresentando uma rampa de aquecimento de 6 °C até 300 °C permanecendo

por 10 minutos. A razão de divisão de 1:10 com uma temperatura de interface de 280 °C e fonte de 260 °C. A faixa de massa de 45 a 600 Daltons, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Foi utilizada uma coluna DB5-MS (30 m × 0,25 mm) com espessura de filme de 0,10 µm e uma fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano, com hélio como gás de arraste.

2.2.2 Cromatografia de exclusão de massa (SEC)

A distribuição da massa molar foi determinada por cromatografia de exclusão de massa, utilizando um dispositivo Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A). Uma coluna PolySepLinear (300 × 7,8 mm) foi usada para análise, com solução de $NaNO_3$ 0,1 mol L^{-1} como eluente, a 30 °C, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção de amostra de 50 µL. Padrões de Pullulan (P-82, Shodex) foram usados, seguindo a equação: Log M = 14,33638 – 1,12336 × Ev.

2.2.3 Viscosidade

A viscosidade do GS foi medida na concentração de 0,1% (m/v) usando um reômetro TA AR-2000 Instruments com sensor de placa cônica de 40 mm de diâmetro a 25 °C e a taxa de cisalhamento variando de 10 s^{-1} a 1000 s^{-1}.

2.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A estrutura molecular do GS foi caracterizada usando FTIR no modo de reflexão total atenuada (ATR), com espectros variando de 4000 a 550 cm^{-1}, empregando o instrumento Nicolet iS5 - iD7.

2.2.5 Análise elementar

A composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio do GS foi obtida por análise elementar usando um analisador Perkin Elmer 2400 Series II CHN com um detector de condutividade térmica. O fator de conversão usado para %N para proteína foi 6,25 (Baethgen; Alley, 1989).

2.2.6 Potencial Zeta (ζ)

O potencial Zeta (ζ) (mV) da GS foi medido pelo equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 utilizando solução aquosa de 1 mg mL^{-1}, em triplicata.

2.2.7 Ácidos urônicos

Os grupos ácidos presentes na GS foram titulados e expressos como uma porcentagem de ácidos urônicos. Para tanto, os grupos ácidos da GS foram então protonados usando uma resina catiônica, que foi previamente protonada com solução de HCl a 1 mol L^{-1}. A solução de GS protonada (100 mg em 20 mL) foi então titulada com solução padronizada de NaOH a 0,076 mol L^{-1}.

2.2.8 Análise térmica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC)

TGA e DSC (10 mg de GS) foram realizados sob fluxo de ar sintético usando um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} em uma faixa de temperatura de 25-600 °C. A taxa de fluxo de ar foi mantida em 60 mL min^{-1} em uma atmosfera de ar inerte (ar sintético).

2.2.9 Difração de raios X

O difratograma de raios X foi obtido usando um equipamento X'Pert PRO MPD (PANalytical BV) e foi realizado usando uma fonte de radiação Cu kα operando a 30 mA e 40 kV, λ = 1,54 em ângulos 2θ 2–80◦ com um tamanho de passo de 0,0200.

2.2.10 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT 135, $^{1}H^{13}C$ HSQC da GS foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Agilent a 400 MHz. A amostra (20 mg) foi dissolvida em óxido de deutério (D_2O), e o ácido 3-(trimetilsilil)propiônico (TSP) foi usado como referência.

2.3 Testes de toxicidade *in vitro*

2.3.1 Hemólise

A compatibilidade da GS com eritrócitos foi testada de acordo com o protocolo de Saharuah et al. (2015). Eritrócitos humanos foram coletados em EDTA (1,8 mg mL^{-1}), lavados três vezes e suspensos em solução salina estéril (0,9%). Diferentes concentrações da GS (variando de 2.000 a 39,06 µg/mL) foram testadas. Triton-X (0,1% v/v) e solução salina (0,85%) foram usados como controles de hemólise positiva e negativa, respectivamente. As misturas (1:1) foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e então centrifugadas a 10.000 *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi avaliado para hemólise espectrofotometricamente (492 nm) usando um leitor de placas ELISA (Bioeasy Touch

Reader). A hemólise total foi obtida com Triton X-100, e a porcentagem de hemólise (PH) foi calculada em relação a esse valor. O experimento foi conduzido em triplicado.

$$PH=(A_{goma}-A_{salina}/A_{tritonX}-A_{salina})\times 100$$

2.3.2 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada nas seguintes linhagens de células cancerosas: HCT-116 (carcinoma colorretal humano - concentração de plaqueamento celular: 7×10^4), PC-3 (adenocarcinoma de próstata humano - 1×10^5), SNB19 (glioblastoma humano - 1×10^6), HL60 (leucemia mieloide aguda - 3×10^5) e B16-F10 (melanoma metastático murino - 6×10^4). Linhagens de células não cancerosas também foram avaliadas: HEK293 (rim embrionário humano - 1×10^5 - fornecido pelo National Cancer Institute, EUA), RAW 264.7 (macrófagos murinos - 1 x 10^6) e L929 (fibroblasto murino - 7×10^4 - fornecido pelo Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ). Meio RPMI 1640 (HCT116, PC-3, SNB-19 e HL60) ou Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (B16F10, HEK293, RAW 264.7 e L929) foram usados para cultivar células, suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (100 μg/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina) e mantidos a 37 °C e atmosfera controlada contendo 5% de CO_2. A análise de citotoxicidade foi realizada usando o método 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio brometo (MTT) (Mosmann, 1983). As placas tratadas com o composto foram incubadas por 72 h em um CO_2 a 5% aquecido a 37 °C.

2.4 Testes de toxicidade *in vivo*

2.4.1 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella*

A avaliação da toxicidade em *G. mellonella* foi realizada de acordo com Balasubramanian et al. (2018), com algumas modificações. Cada grupo experimental consistiu de 16 larvas selecionadas aleatoriamente (250-300 mg). Para o teste, a GS foi dissolvido em tampão fosfato (PBS), e 10 μL de doses de 50, 25 e 10 mg/kg foram inoculados no último proleg esquerdo de larvas de diferentes grupos, usando uma seringa Hamilton. O grupo controle recebeu apenas PBS estéril. Após os tratamentos, as larvas foram incubadas a 37 ºC por sete dias e verificadas diariamente para sobrevivência.

2.4.2 Teste para determinação de toxicidade aguda em camundongos

Camundongos Babl/c (fêmeas), com idades entre 8 e 12 anos e pesando 25 e 36 g foram obtidos da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram divididos em dois grupos (n= 5) e mantidos sob temperatura controlada (25±2 °C) em um ciclo de 12h claro/12h escuro, com consumo monitorado de alimento e água (100 g e 100 mL, respectivamente). Todos os tratamentos, procedimentos e protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (CEUA/UFDPar), sob o número de protocolo 002/2021 (anexo 1) e seguiram a Diretiva da Comissão Europeia 2010/63/UE (DCE, 2010) sobre experimentos com animais.

Para avaliar a toxicidade aguda da GS na dose de 2.000 mg/kg, foi utilizada a metodologia clássica de toxicidade aguda oral descrita pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 423/2002 (OECD, 2002), que coordena os testes de toxicidade *in vivo*. Os animais foram avaliados segundo parâmetros de triagem hipocrática, conforme proposto por Brito (1994). Durante 14 dias, foi monitorado o consumo de água e ração, bem como a produção de excretas e aspecto fecal. Parâmetros bioquímicos e hematológicos também foram avaliados. Ao final do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12h e anestesiados. Após eutanásia (dose combinada de cetamina (60 mg/kg, ip) e xilazina (8 mg/kg, ip), parâmetros bioquímicos, hematológicos, massa média de órgãos e análise histológica do fígado, baço, rim, coração e intestino dos animais. As seções da coloração da eematoxilina-eosina (HE) foram usadas para avaliação histomorfométrica do fígado, rim, baço, coração e intestino. Exceto pelo volume glomerular, que foi realizado de acordo com o método proposto por Choi et al. (2020), para cada parâmetro avaliado, um avaliador cego fez 64 medições por animal de fotomicrografias usando uma lente Zeiss 40 ×/0,65. As imagens foram obtidas com uma cor Zeiss Axiocam 105 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha) e as medições foram feitas usando o software ImageJ® versão 1.53..

2.5 Análise estatística

Os dados dos ensaios de eritrócitos foram expressos como média e desvio padrão e analisados estatisticamente usando ANOVA bidirecional com teste de comparação múltipla de Tukey, usando o software GraphPad Prism 6.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

Os experimentos de citotoxicidade foram analisados a partir de um experimento quadruplicado usando a média ± desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o software GraphPad Prism7.01.

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para *G. mellonella* foram geradas e analisadas com o teste de log-rank (Mantel-Cox) usando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Para todos os experimentos em camundongos, a média ± erro padrão da média (EPM) foi calculada com base no número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pela comparação entre as médias, realizada pelo "teste t" de Student no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). A significância estatística foi considerada quando $p< 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e composição de GS

Após o isolamento da GS, observou-se um pó branco (figura 1D). O rendimento foi de 51,15%, comparável ao relatado para a GS obtido no Ceará-Brasil (Pinheiro *et al*., 2023), mas inferior ao de outras arabinogalactanas (Ribeiro *et al*., 2023; Chaves *et al*., 2024). No entanto, considerando que o exsudato (figura 1C) apresentou alta viscosidade após a solubilização, essa característica pode ter se refletido no baixo rendimento causado por perdas durante a etapa de filtração (anexo 2) (Dos Santos Ferreira *et al*., 2019). Para melhorar o rendimento da goma, adicionar temperatura ao processo de dissolução do exsudato pode ser uma alternativa. Isso pode favorecer as interações intermoleculares com a água e reduzir a viscosidade (De Sousa Ferreira *et al*., 2023).

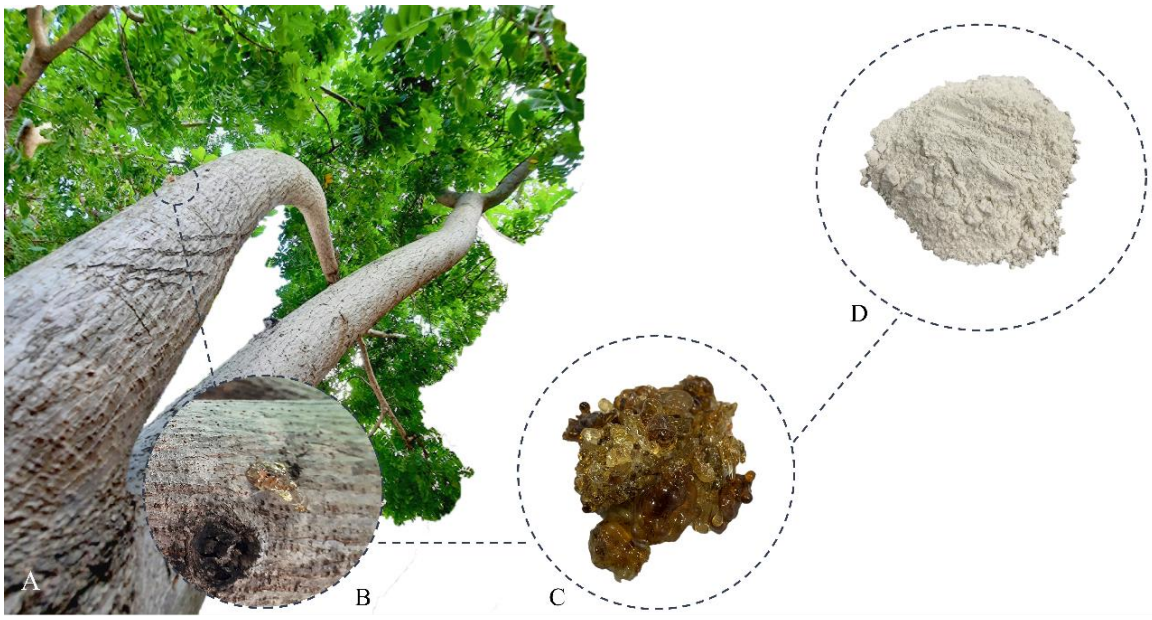


Figura 1. Esquema para obtenção da GS. Em A: árvore *S. purpurea*, em B: corte do caule demonstrando liberação de exsudato, em C: exsudato coletado, e em D: GS isolada.

A composição de açúcar neutro da GS foi determinada após a hidrólise apresentada na Tabela 1. É demonstrada uma composição de monossacarídeos principalmente de galactose, seguida de arabinose (anexo 3). A razão molar mantida entre a maioria é 1,8. Isso difere das proporções relatadas anteriormente: 1,6 para a GS, obtida no Ceará-Brasil (Teixeira *et al*., 2007) e 6,5 na Venezuela (Pinto *et al*., 1995). No entanto, há uma semelhança mais próxima na composição de monossacarídeos da GS do Ceará, Brasil (Teixeira *et al*., 2007), em relação à presença de galactose (Gal), arabinose (Ara), glicose (Gli), manose (Man), xilose (Xil) e seus níveis aproximados (%) (Tabela 1). A proporção estabelecida entre os monossacarídeos encontrados é de 1:0,55:0,05:0,04:0,03 para Gal:Ara:Gli:Man:Xil, respectivamente.

Tabela 1. Caracterização a GS.

Amostra	GS	GS[a]	GS[b]
Massa molar (g/mol)	$5{,}58 \times 10^5$	$6{,}6 \times 10^5$	$1{,}6 \times 10^6$
Umidade (%)	8,91	9,3	8,23
C (%)	36,2	-	-
H (%)	5,81	-	-
N (%)	0,27	0,3	0,32
Proteína (%)	1,58	2,1	2,00
Potencial Zeta (ζ) mV	- 43,1	-	-
Ácido urônico (%)	16,24	17,0	26
Composição do açúcar neutro após hidrólise* (%)			
Galactose	45,08	43,3	59
Arabinose	24,70	31,2	9
Glicose	2,04	1,3	-
Manose	1,87	-	2
Xilose	1,55	1,3	2
Fucose	-	3,6	-
Ramnose	-	2,5	2

*Corrigido para umidade.

[a]Teixeira et al., 2007.

[b]Pinto et al., 1995 and Pinto et al., 1996.

A análise elementar da GS (Tabela 1) mostrou 36,2% de carbono, 5,81% de hidrogênio e apenas 0,27% de nitrogênio. O baixo teor de nitrogênio pode ser atribuído a traços de proteína ligados à goma. Após utilizar o fator de conversão em %N, a GS apresentou valor proteico (Tabela 1) menor que o relatado para outras arabinogalactanas, como a GS do Ceará-Brasil (Teixeira *et al*., 2007), goma de cajueiro (Ribeiro *et al*., 2020),

goma de limoeiro (Ribeiro *et al*., 2023) e goma de angico vermelho (Lopes *et al*., 2024). Esses valores podem estar associados ao processo de isolamento do polímero, no qual a proteína residual pode ser proveniente de um complexo arabinogalactana-proteína, que pode persistir na goma após o processo de isolamento (Costa; Rodrigues; Paula, 1996).

3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro FT-IR da GS é apresentado na Figura 2, que exibe bandas de absorção características, entre 4000 e 550 cm^{-1}. Observa-se o aparecimento de bandas típicas da goma, como bandas em torno de 3283 cm^{-1}, características do O-H, que podem estar associadas à água ligada ao polissacarídeo. C-H estiramento em torno de 2939 cm^{-1}, bandas em torno de 1030 cm^{-1} relacionadas às ligações glicosídicas C-O-C e ligações O-H dos álcoois. A presença da banda em 1600 cm^{-1} está possivelmente relacionada ao estiramento assimétrico das vibrações COO-, que podem estar associadas ao carboxilato e O-H de possível água ligada. As bandas na região de 1413 a 1300 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento simétrico de COO-, e 1366 cm^{-1} à deformação simétrica de C-O (Ribeiro *et al*., 2020; Ribeiro *et al*., 2021; Chaves *et al*., 2024).

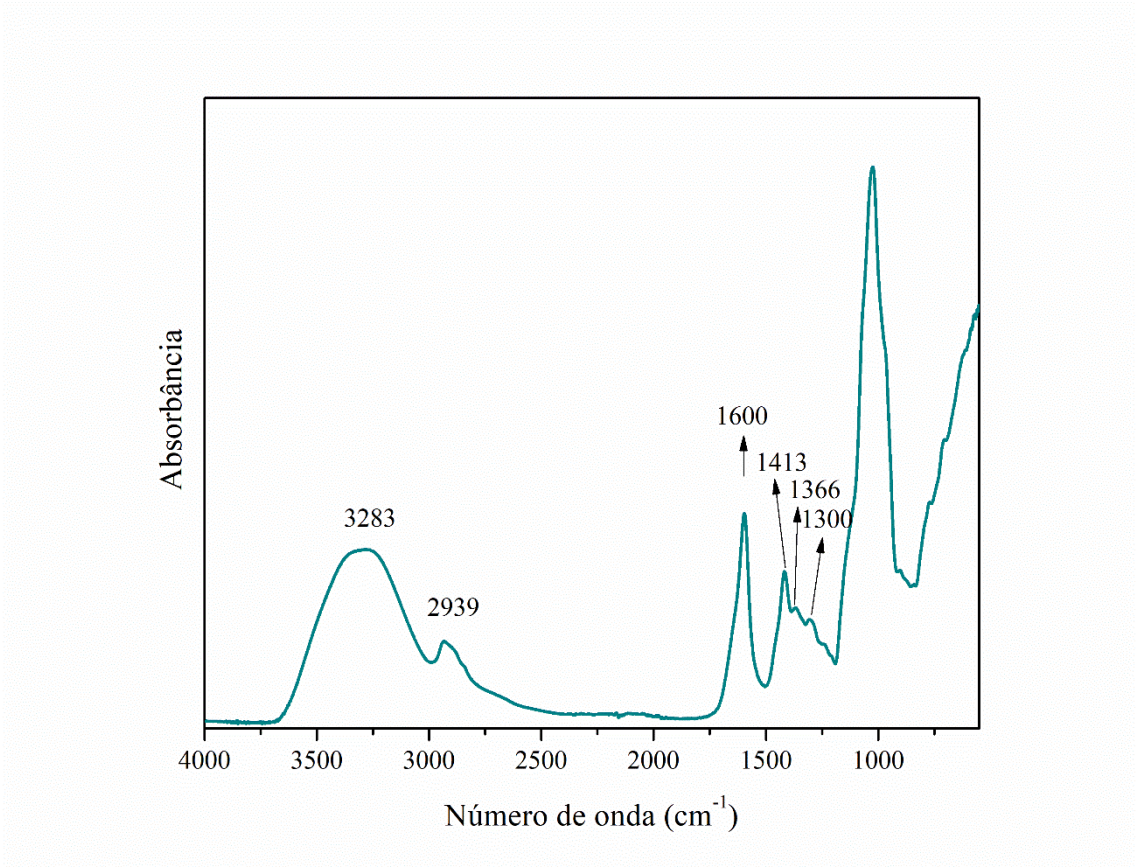


Figura 2. Espectro infravermelho da GS.

3.3 Ácidos urônicos

Após a obtenção da GS protonada, a porcentagem de ácido urônico encontrada (Tabela 1) é ligeiramente menor do que a relatada anteriormente para as variedades brasileira (Teixeira *et al*., 2007) e venezuelana de *S. purpurea* (Pinto *et al*., 1995), que foram de 17,0% e 26%, respectivamente. No entanto, a quantidade de ácido urônico corrobora a observação no espectro de infravermelho. A intensidade da banda característica, diretamente relacionada à abundância (absorbância), além do potencial zeta negativo (Tabela 1), devido à presença de grupos carboxilato (Laine, 1994; Wang *et al*., 2011). A adição de NaCl durante o isolamento da GS aumenta as interações de grupos carregados com aumento de contra-íons, refletindo também na redução do potencial zeta (Carneiro-Da-Cunha *et al*., 2011; Ribeiro *et al*., 2023).

3.4 Massa molar

GS apresentou uma ampla distribuição de massa molar, como demonstrado na figura 3, com um índice de polidispersão de 34,4 e com um pico em 7,9 mL, além de um pequeno ombro em 8,6 mL. Em contraste, o isolamentos de Teixeira et al. (2007), apresentaram 2 picos distintos, além da presença de um ombro. A GS do presente estudo é semelhante à distribuição de massa molar relatada por Pinto et al. (2000), com uma distribuição homogênea. No entanto, sua Mw apresentado na Tabela 1 está mais próximo da GS de Teixeira et al. (2007), no qual o mesmo método foi utilizado para o isolamento.

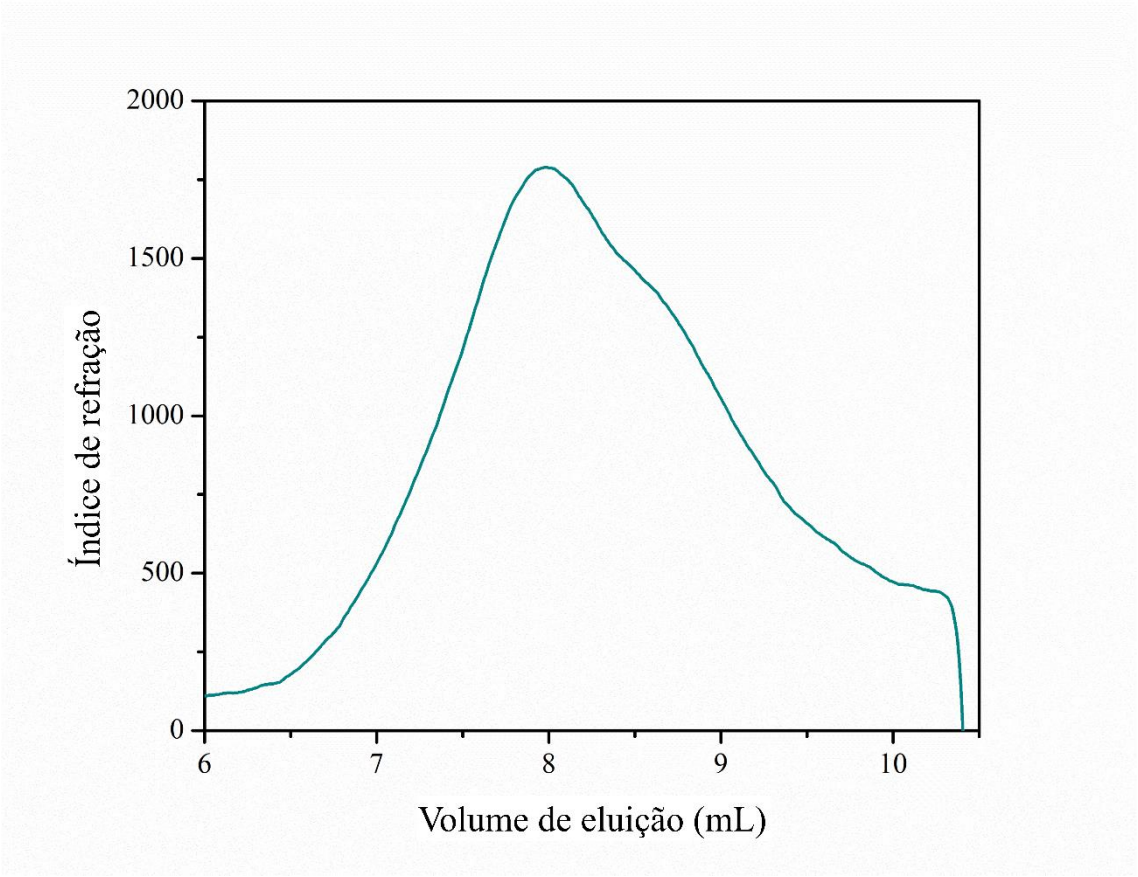


Figura 3. Cromatograma de distribuição de massa molar.

3.5 RMN

A figura 4 mostra os espectros de ^{1}H, ^{13}C, DEPT e HSQC da GS. O espectro de RMN de ^{1}H apresenta sinais amplos característicos dos polissacarídeos. O sinal em 1,20 ppm foi atribuído ao H-3 do metil ramnosídico. Prótons H-2-H-5 entre 3,2-4,5 ppm. Além disso, há 7 sinais anoméricos, destacando a presença de β-D-galactose em 4,44 e 4,58 ppm, que constituem a cadeia principal. A presença de α-L-arabinofuranose em 5,08-5,14 ppm. Além dos sinais em 4,52 ppm de ácido glucurônico, 5,2 ppm de ácido 4-O-metil glucurônico e 5,61 de β-D-glicose (De Pinto *et al*., 1995; Pinheiro *et al*., 2023).

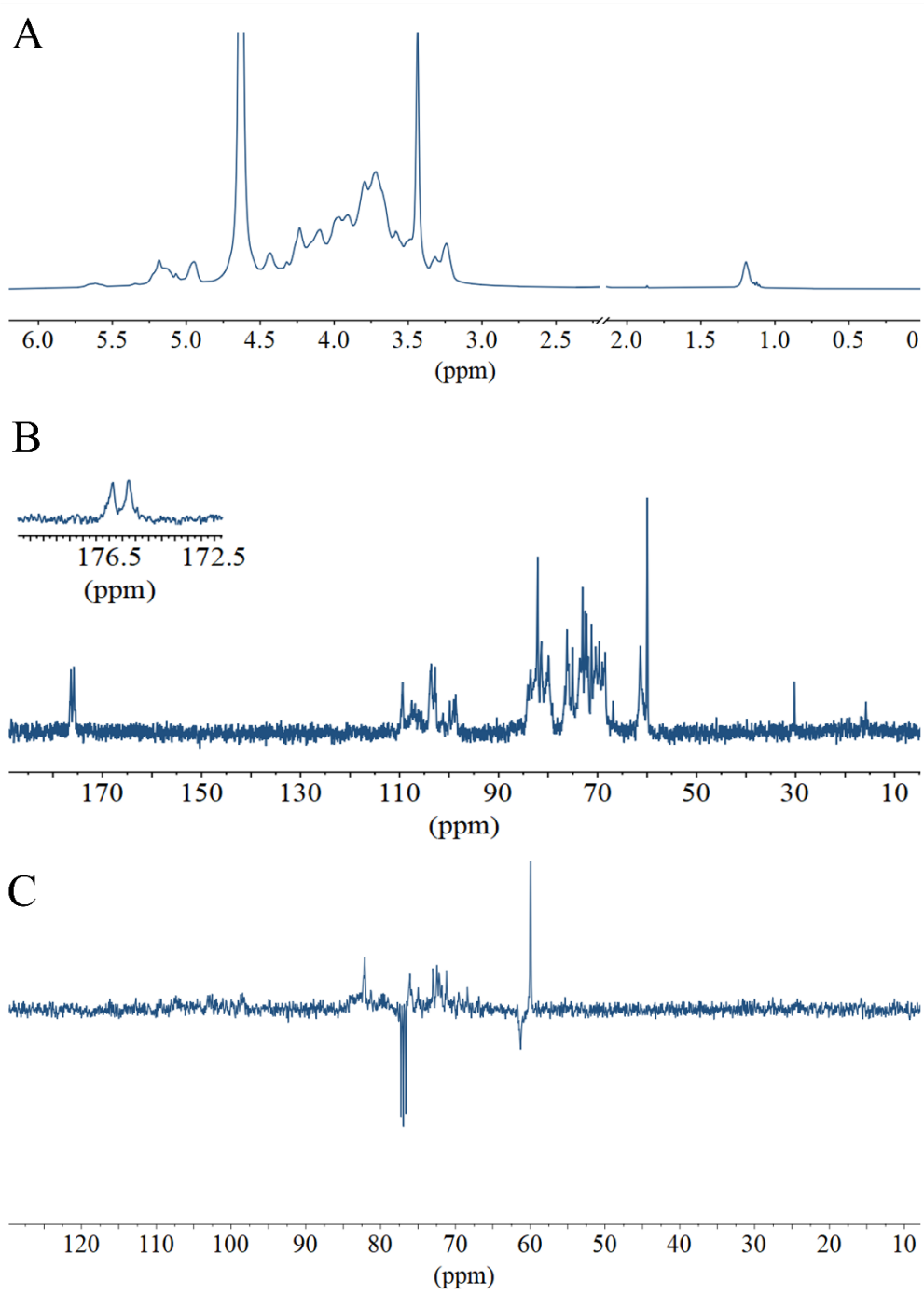


Figura 4. Espectros de RMN 1D da GS em D_2O (A) espectro de RMN de ^{1}H; (B) espectro de RMN de ^{13}C; (C) espectro DEPT 135.

Para o espectro de ^{13}C, foi possível identificar sinais relacionados à cadeia principal e ramificações (Tabela 2) conforme relatado anteriormente (Teixeira *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2023). Um sinal em 15,80 ppm de α-L-ramnopiranose metil residual foi apresentado. Além disso, sinais em 175,70 ppm e 176,30 ppm, também observados

por Teixeira et al. (2007), foram relacionados à carbonila de resíduos de ácido glucurônico. Na região do carbono anomérico, em 103,60 ppm foi atribuído a resíduos de β-D-Xil*p*, e um sinal de β-D-galactopiranose (1→3) foi observado em 103,70 ppm. A presença de α-L-arabinofuranose foi observada em 107,40 ppm e 109,30 ppm com intensidade de sinal semelhante àquelas relatadas anteriormente para GS obtidas no Ceará-Brasil (Teixeira *et al*., 2007; Pinheiro *et al*., 2023), e diferindo da variante venezuelana (De Pinto *et al*., 1995), o que se reflete nos dados de composição conforme mostrado na Tabela 1. O carbono anomérico para 4-OMe-α-D-GlcA também foi observado em 99,80 ppm, além do sinal em 60,00 ppm do grupo metoxila ligado. O espectro DEPT 135 (Fig 4C) confirmou essa atribuição pela presença do sinal negativo (CH_3) em 61,33 ppm.

Tabela 2. Deslocamento químico de RMN de ^{13}C para GS, deslocamento químico (ppm).

Tipo de ligação	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH_3
→3)β-D-Gal(1→	103.70	71.22	82.11	69.69	75.04	61.34	
→6)β-D-Gal(1→	101.32	70.36	72.49	67.68	73.05	68.46	
α-L-Ara*f*(1→	109.30	81.37	76.12	83.80	61.2		
→3)α-L-Ara*f*(1→	107.40	80.70	83.59	84.13	61.2		
β-D-AGlc	103.70	75.8	76.17	73.77	75.8	175.70 176.30	
4-OMe-α-D-AGlc	99.80	72.22	73.05	82.43	70.80	59.95	60.00
α-L-Ram*p*	-	-	-	-	-	-	15.80

O espectro HSQC da GS mostra as correlações de deslocamentos químicos de ^{1}H-^{13}C das principais unidades de cadeia e ramificações. C-6/H-6 do grupo metil de α-L-Ramp em δ1,21/15,81, δ3,44/60,0 de 4-OMe-β-D-GlcA e δ3,96/63,00 para resíduo de β-D-Man. C-4/H-4 em δ3,61/71,43 de resíduos de β-D-Xylp-(1→. C-1/H-1 de β-D-Galp (1→3) e β-D-Galp (1→6) em δ4,44/103,7 e δ4,58/101,32, além de C-1/H-1 de β-D-Galp (1→) em δ4,96/98,79 (HAY et al., 2024). Correlação de C-1/H-1 de δ-L-Araf (1→3) (δ5,08/107,50), α-L-Araf(1→) (δ5,23/109,3) e 4-OMe-β-D-GlcA (δ5,2/99,80) (De Pinto *et al*., 1995; Teixeira *et al*., 2007; Pinheiro *et al*., 2023).

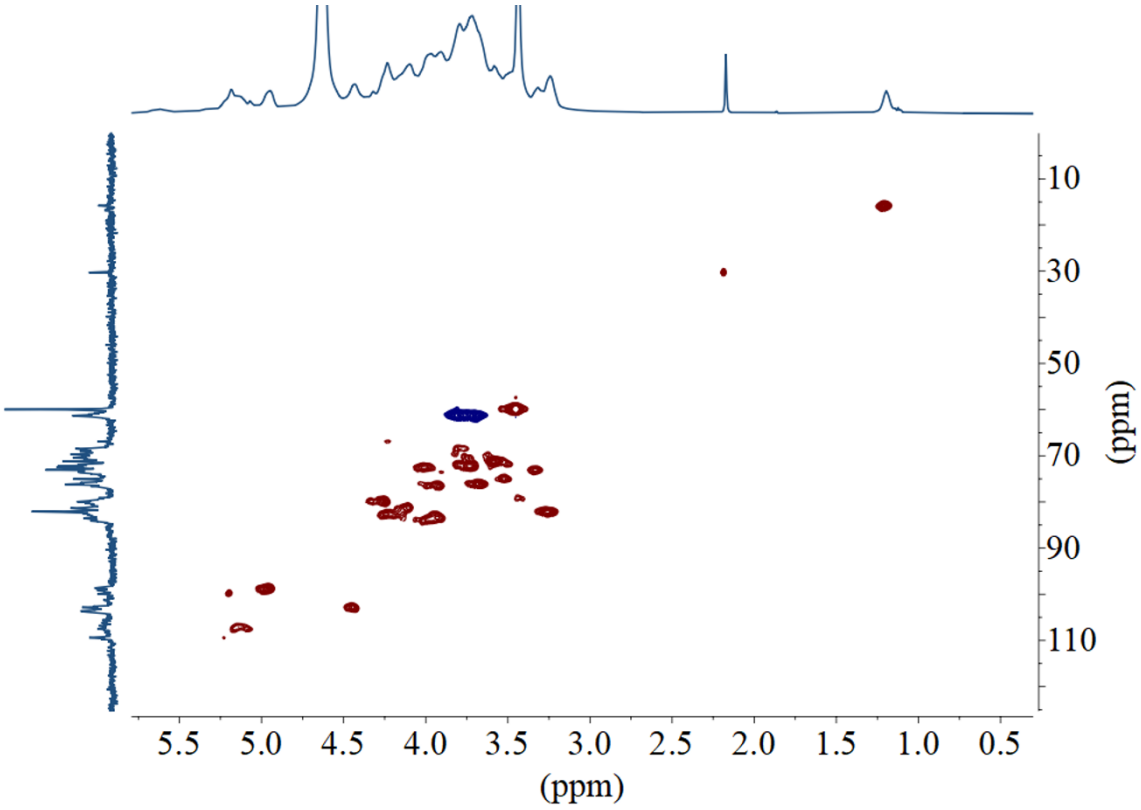


Figura 5. Espectro de RMN de HSQC de $^{1}H/^{13}C$ da GS em D_2O.

De acordo com os achados do presente estudo e relatos na literatura (De Pinto *et al*., 1995; Teixeira *et al*., 2007; Pinheiro *et al*., 2023) sobre a estrutura da GS, sua cadeia principal é composta por β-D-Galp ligado (1→3) e (1→6), com substituições laterais de α-L-Araf (1→3) e α-L-Araf(1→), além de β-D-GlcA, 4-OMe-β-D-GlcA, α-L-Ramp, β-D-Glu e β-D-Xilp, como resíduos terminais (figura 6). No entanto, a sobreposição de alguns sinais tornou difícil atribuir os resíduos presentes com precisão. Mais experimentos são necessários com a GS isolado e subsequentemente hidrolisado, para

obter melhores espectros de resolução e atribuição completa dos padrões de ligação dos resíduos restantes.

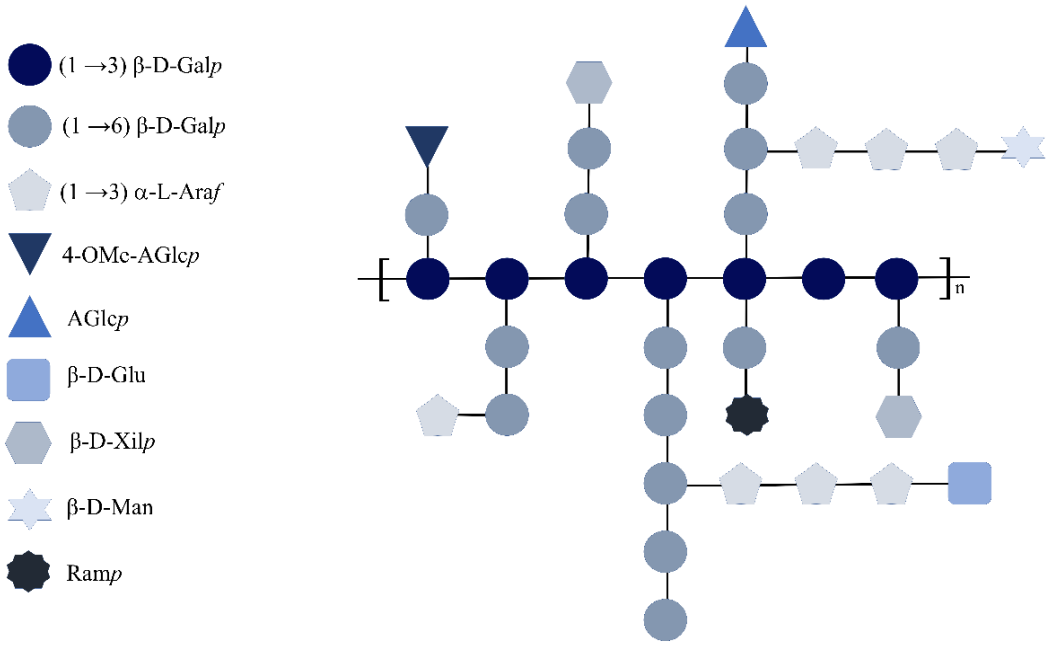


Figura 6. Padrão estrutural da GS obtido por análise estrutural.

3.6 Viscosidade

A propriedade reológica da solução GS 1% avaliada nos permitiu observar o comportamento da viscosidade resultante da taxa de cisalhamento aplicada (Figura 7A). Na menor taxa de cisalhamento a viscosidade foi de 0,1109 Pa.s. enquanto na maior taxa, a viscosidade foi de 0,0336 Pa.s. A diminuição da viscosidade pode estar relacionada ao desembaraço da cadeia polimérica durante o aumento da taxa de cisalhamento (Freitas *et al.*, 2023). A curva de fluxo na figura 7B, com a tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento da GS, demonstra que o comportamento pseudoplástico foi observado.

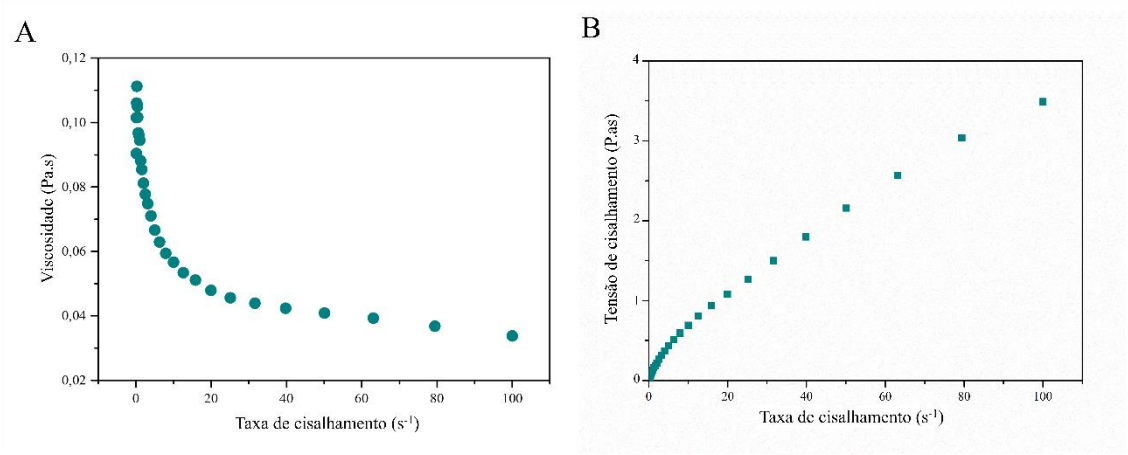


Figura 7. Curva de viscosidade (A) e curva de fluxo (B) da GS.

3.7 Análise térmica e XDR

As curvas TG/DTG para GS são mostradas na figura 8A, demonstrando que há três estágios de degradação da GS. O primeiro evento ocorre de 33,8 ºC a 129,4 ºC, e é atribuído à perda de água, bem como compostos voláteis, resultando em uma perda de massa de 11,96%. O segundo evento ocorre de 246,6 ºC a 300,3 ºC, com um ombro de 300,4 ºC a 342,1 ºC, correspondendo à condensação de grupos hidroxila, com uma perda de massa de 50,47%. O terceiro evento começa em 392,7 ºC a 427 ºC, com um ombro de 427,5 ºC a 482,2 ºC. Este evento foi atribuído à degradação térmica da estrutura do polissacarídeo com uma perda de massa de 22,58%. A massa residual a 600 ºC da GS é apresentada 14,99 %. (Silva et al., 2006; Ribeiro et al., 2023; Lopes et al., 2024).

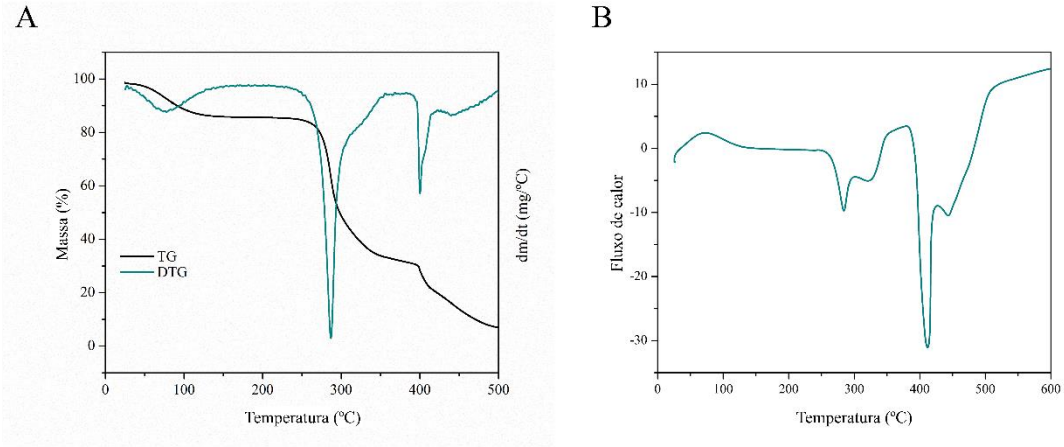


Figura 8. Curva termogravimétrica e curva derivada (A) e DSC (B) da GS.

A curva DSC para GS é mostrada na figura 8B. Ela apresenta um pico endotérmico a 72,1 ºC, atribuído à perda de água como primeiro evento. Adicionalmente, há picos exotérmicos a 283,6 ºC, seguidos por um ombro a 320,8 ºC e 411,5 ºC, com um ombro a 442,7 ºC correspondendo à decomposição térmica do polímero. Esses resultados corroboram os eventos de decomposição térmica, demonstrados na figura 8A. Esses resultados apresentam GS como um biomaterial com alta estabilidade térmica (Bashir *et al*., 2018).

O difratograma de XRD apresentado na figura 9 para GS demonstra um semicristalino, com um sinal único e intenso em 18,9 a 25° θ. Este é um comportamento representativo para arabinogalactanas, que podem exibir tal amorfismo devido às suas características estruturais e interações conformacionais (Feoktistova *et al*., 2008; Kuznetsov *et al*., 2017). A fonte de obtenção interfere no nível de organização molecular da cadeia do polímero, que por sua vez interfere em sua cristalinidade, e esta característica semicristalina é observada (Gorshkova, 2013).

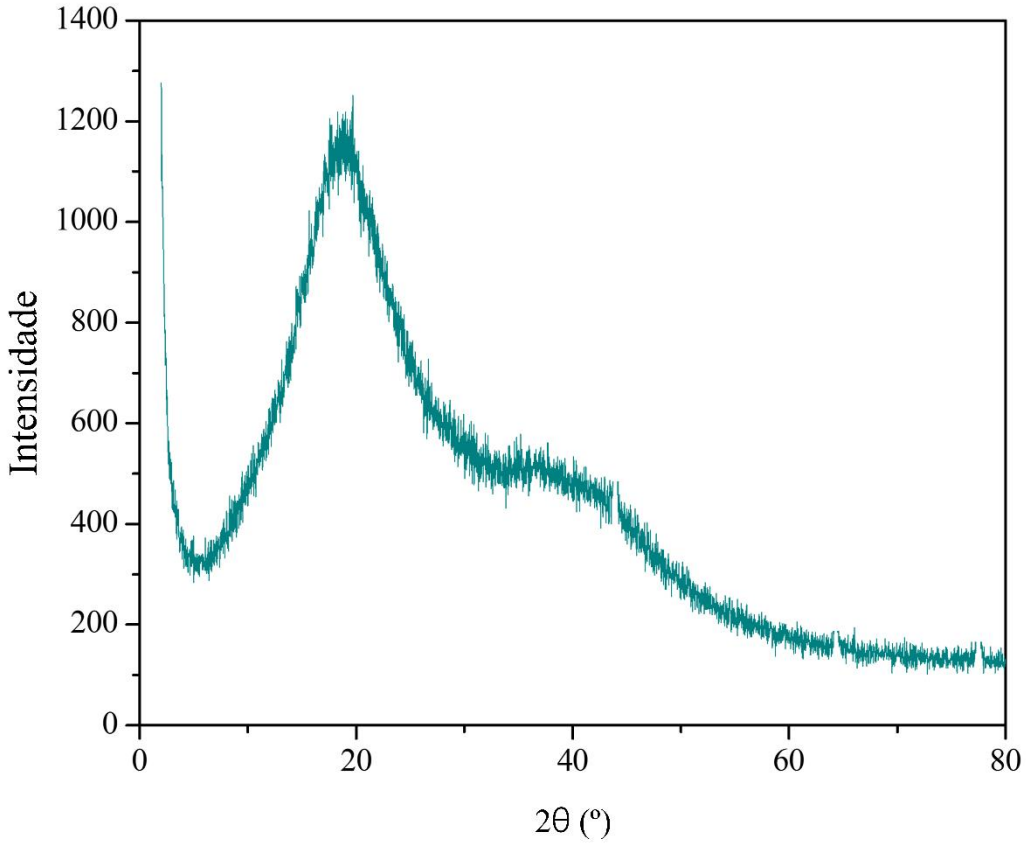


Figura 9. Difratograma da GS.

3.8 Hemólise

O teste de hemocompatibilidade em eritrócitos foi realizado para observar o perfil hemolítico da GS. Considerando que o eritrócito é uma célula muito vulnerável devido à sua membrana celular e desempenha uma função importante no organismo (Sharma *et al*, 2014). Os resultados são mostrados na figura 10, é possível observar que na maior concentração testada (2.000 µg mL^{-1}) a GS não causou hemólise acima de 2%, caracterizando-o como material não hemolítico (<5%) de acordo com a ISO10993 - critério 4 (Standard, 2017). Isso sugere que a GS é um polissacarídeo promissor para aplicações biomédicas.

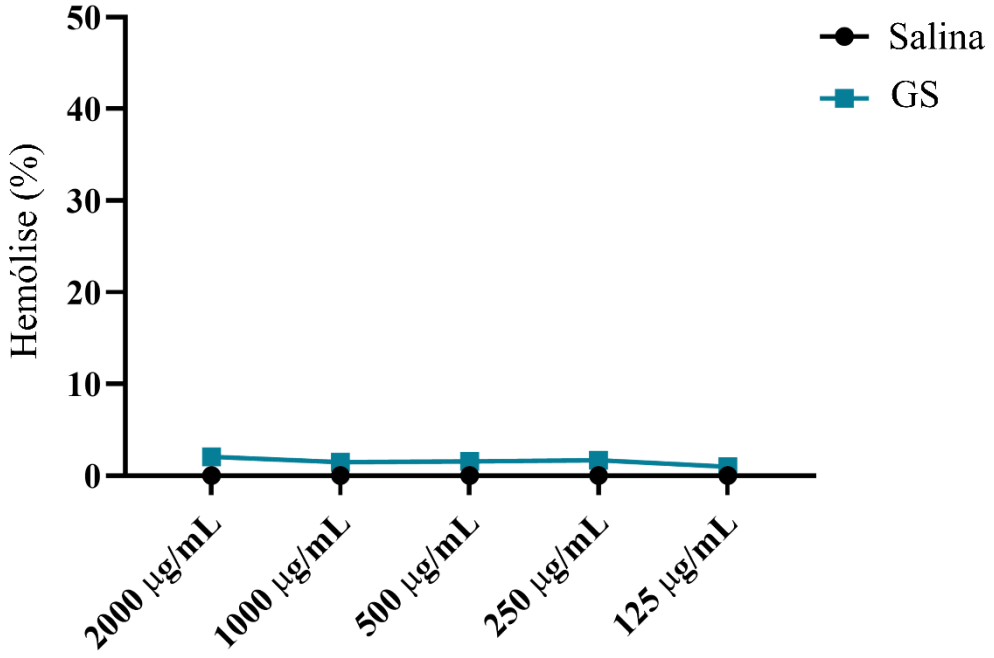


Figura 10. Gráfico do perfil hemolítico da GS.

3.9 Teste de citotoxicidade

O perfil de citotoxicidade da GS verificado para células cancerosas e não cancerosas (figura 11A) demonstra que uma concentração de 500 µg mL^{-1} não inibiu >30% nenhuma das linhagens celulares testadas. As porcentagens antiproliferativas foram: 14,90±0,94% para HCT116, 23,78±3,12% para PC-3, 10,46±0,80 para SNB19, 8,03±1,87% para HL60, 16, 99±1,60% para B16F10, 1,40±1,12% para HEK293 e 18,02±2,27% para L929. Para os macrófagos RAW 264.7, o gráfico (figura 11B) mostra

a viabilidade resultante da concentração, com 40 mg mL^{-1} a viabilidade celular reduzida para 63%, concentração esta muito superior à avaliada anteriormente em outras linhagens celulares, apresentando um CC_{50} de 58,44 mg mL^{-1}. A GS não demonstrou efeito citotóxico *in vitro*, demonstrando sua segurança nas concentrações testadas, perfil observado para outras gomas apenas em concentrações menores (Silva *et al*., 2020; Ribeiro *et al*., 2023; Brito *et al*., 2023).

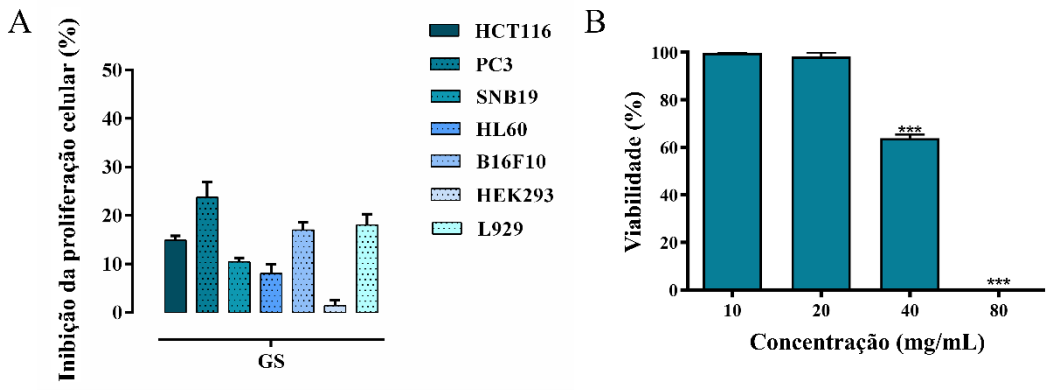


Figura 11. Gráfico de citotóxicidade em células tumorais e não tumorais (A) e em (B), macrófagos da GS.

3.10 Toxicidade em *G. mellonella*

A curva de sobrevivência das larvas tratadas com doses de 50, 25 e 10 mg/kg da GS é apresentada na figura 6D, é possível observar que o tratamento em diferentes doses reduziu a sobrevivência em apenas 6,3% até o sétimo dia de acompanhamento. Esses resultados indicam que a GS, mesmo com aumento nas doses, não diferiu em termos da curva de sobrevivência. Considerando a similaridade da resposta imune de *G. mellonella* com a de mamíferos, o perfil não tóxico demonstrado nas condições testadas sugere que a GS para aplicações biomédicas (Gorr *et al*., 2019; Mccloskey *et al*., 2019).

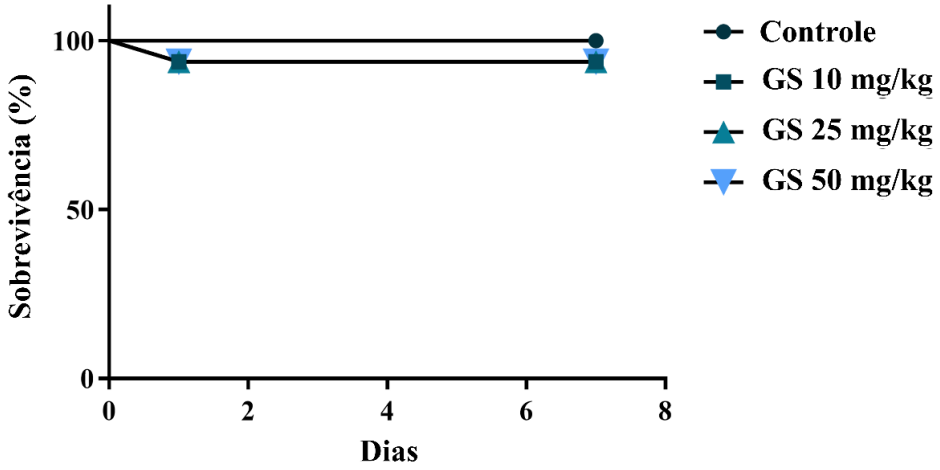


Figura 12. Gráfico de toxicidade *in vivo* em *G. mellonella* (D).

3.11 Toxicidade aguda em camundongos

As análises realizadas durante o período de teste de toxicidade mostraram que a dose administrada de 2.000 mg/kg no grupo avaliado (GS) não causou morte ou sinais tóxicos nos animais. Além disso, todos os grupos experimentais não apresentaram anormalidades relevantes ao longo do estudo e sobreviveram até o último dia de análise. Não houve diferença significativa entre os grupos em termos de alterações clínicas ou comportamentais (anexo 3). Em relação ao consumo de água, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, seja em termos de alimentação ou produção de excretas (diarreia e/ou constipação) (tabela 3) após 14 dias consecutivos. Assim como em relação ao peso corporal e órgãos como coração, intestino delgado, fígado, rim e baço, incluindo peso relativo (tabela 4), marcadores bioquímicos e parâmetros hematológicos (tabela 5).

Tabela 3. Análise dos hábitos fisiológicos diários de camundongos tratados com a GS (2.000 mg/kg). Os valores são representados como média ± EPM. *p<0,05 quando comparado com o grupo SAL.

Tratamento	Consumo de água (mL/dia)	Consumo de ração (g/dia)	Produção de excrementos (g/dia)	Produção de fezes
SAL	26,43 ± 1,51	28,21 ± 1,33	5,07 ± 0,51	8,35 ± 0,35
GS	27,21 ± 1,15	29,14 ± 1,38	5,38 ± 0,83	7,15 ± 0,43

Em testes de toxicidade aguda, é importante observar padrões que indiquem toxicidade em animais. A toxicidade pode se manifestar sistemicamente, com redução da massa corporal dos animais tratados e alterações discrepantes na massa relativa dos órgãos (Tofovic; Jackson, 1999; Gonzalez; Silva, 2017). Como mencionado anteriormente, nosso ensaio não mostrou alterações significativas nesses parâmetros. Entre os órgãos analisados, o principal órgão responsável pela depuração de xenobióticos e compostos estranhos, o fígado, não apresentou diferença significativa entre o grupo controle (SAL) e o grupo GS (Katzung; Masters; Trevor, 2014).

As variações de peso são de suma importância em testes de toxicidade oral aguda, pois o organismo pode rapidamente indicar uma potencial toxicidade através da variação brusca do peso corporal, esse índice também pode estar relacionado à melhora da condição e do estado nutricional do organismo, sendo comumente avaliado na maioria dos testes de toxicidade (Pieme *et al*., 2006; Pires Júnior *et al*., 2012; Barbosa, 2014). Aproximadamente 75% do peso total de um animal equivale a água e sangue, contendo eritrócitos, leucócitos e plaquetas correspondendo a 10% do peso corporal.

Tabela 4. Análise do peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com a GS (2.000 mg/kg) após 14 dias de tratamento. Os valores são representados como média ± EPM. *p<0,05 quando comparado com o grupo SAL.

Peso corporal (g)	**SAL**	**GS**
Dia 0	20.00 ± 1.89	27.50 ± 1.50
Dia14	24.00 ± 1.41	29.00 ± 1.00
Peso relativo dos órgãos		
Baço	0.45 ± 0.01	0.38 ± 0.02
Coração	0.59 ± 0.04	0.45 ± 0.06
Fígado	4.44 ± 0.32	4.32 ± 0.35
Intestino	5.25 ± 0.30	4.78 ± 0.40
Rim	1.47 ± 0.07	1.39 ± 0.04

Assim, após a administração do composto avaliado, o animal deve estar clinicamente estável, com hábitos normais e peso corporal estável (Gonzalez; Silva, 2017), o que foi observado no presente experimento. Outra análise importante na investigação de toxicidade são os padrões teciduais dos órgãos. Essa análise é essencial devido à possibilidade de mensurar o tipo e a intensidade da lesão causada por um determinado composto, neste estudo, tal análise foi realizada e os resultados do grupo tratado com a goma foram consistentes com os demais achados de toxicidade.

Tabela 5. Análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos tratados com a GS (2.000 mg/kg) após 14 dias de tratamento.

Parameter	SAL	GS
ALT (U/mL)	28,16±3,57	30,49±3,40
AST (U/mL)	103,90± 5,36	106,70± 4,72
Creatinina (mg/dL)	0,60 ± 0,18	0,85 ± 0,07
Eritrócitos (10^6/mm^3)	5,010 ± 0,49	5,218 ± 0,33
Hematócrito (%)	44,67 ± 1,45	43,00 ± 0,40
Hemoglobina (g/dL)	15,35 ± 1,21	17,46 ± 0,94
VCM (fL)	63,86± 3,87	65,63± 3,65
HCM (pg)	23,86± 1,91	24,23± 1,26
CHCM (g/dL)	32,37± 1,50	33,68± 1,38
Leucócitos Totais (10^3 células/µL)	4,880 ± 0,49	4,613 ± 0,62
Linfócitos (10^3 células/µL)	29,50 ± 1,19	26,50 ± 3,59
Neutrófilos (10^3 células/µL)	60,00 ± 0,00	61,75 ± 359
Eosinófilos (10^3 células/µL)	1,250 ± 0,25	2,000 ± 0,40
Monócitos (10^3 células/µL)	7,250 ± 0,85	6,500 ± 0,86
Basófilos (10^3 células/µL)	2,000 ± 0,57	2,250 ± 0,94
Plaquetas (µL)	775,00 ± 11,90	758,50 ± 11,27

- Os valores são representados como a média ± EPM. *p <0,05 quando comparado ao grupo SAL.

Em relação ao consumo de água, ração e produção de excretas, não foram observadas alterações significativas nos grupos estudados. Esses parâmetros são importantes para avaliar a toxicidade sistêmica, razão pela qual são utilizados nesses tipos de testes experimentais. Juntos, esses resultados, de acordo com a Diretriz 423 da OCDE (2002), sugerem baixa toxicidade da GS.

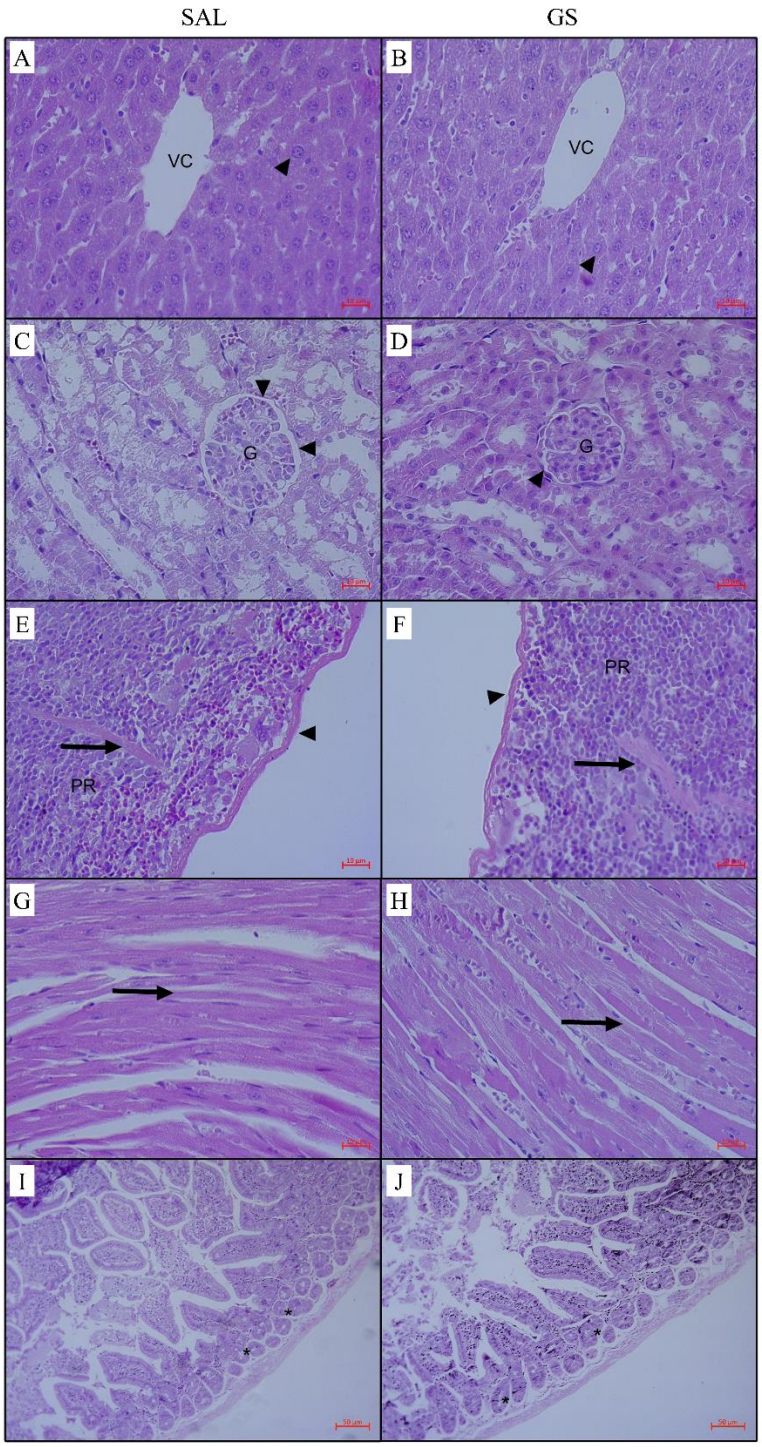


Figura 13. Histopatologia de órgãos vitais no processo de toxicidade: Fígado do grupo salina (A) e grupo GS (B) com estrutura usual de hepatócitos (ponta de seta) irradiando a veia central (VC); Córtex renal de salina (C) e GS (D) com glomérulo (RG), espaço de Bowman (ponta de seta); Histologia do baço de salina (E) e GS (F), com polpa vermelha (RP) permeada por trabéculas de tecido conjuntivo (seta) e cápsula (ponta de seta); Histologia do músculo cardíaco de salina (G) e GS (H). Intestino delgado de salina (I) e GS (J) com vilosidades cilíndricas altas, lâmina própria e criptas (asterisco).

As avaliações histológicas do fígado, rim, baço, coração e intestino não apresentaram alterações em comparação ao controle (figura 13). O tecido hepático (figura 13A) dos animais que receberam GS (figura 13B) não apresentou sinais de toxicidade, como necrose e esteatose, e houve ausência de dilatação da veia central, sem diferença estatística entre os grupos (figura 14A). No rim (figura 13C – SAL e 13D - GS), especificamente no glomérulo, não houve aumento do volume glomerular (figura 14B), e as unidades de filtração estavam intactas (figura 13C-D).

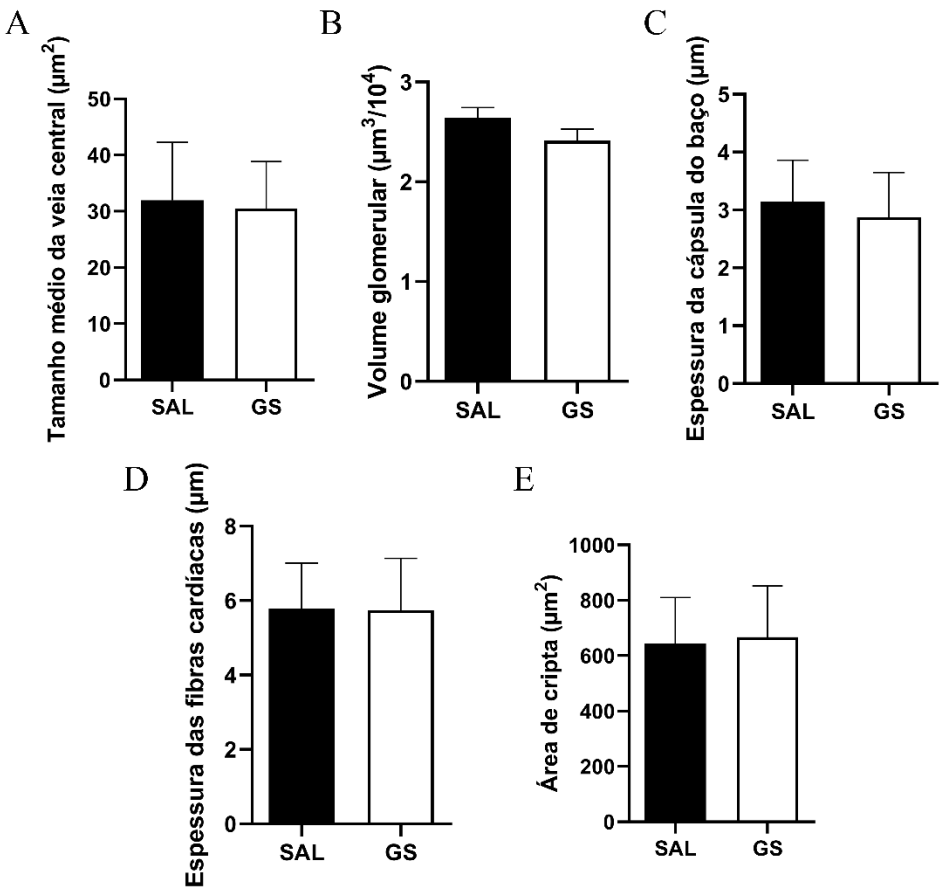


Figura 14. Gráficos da avaliação histomorfométrica dos orgãos dos grupos SAL e GS. Tamanho médio da VC (A), volume glomerular (B), espessura da cápsula do baço (C), espessura das fibras cardíacas (D) e área de cripta (E). Os resultados são expressos pela média ± EPM.

O baço não apresentou infiltrado inflamatório (figura 13E-F) e nenhuma alteração significativa na espessura da cápsula (figura 14C). Ausência de dano agudo ou áreas de infarto foi observada na histologia cardíaca (figura 13G-H) em comparação ao grupo

SAL. As fibras cardíacas estavam dispostas da maneira usual, não apresentando diferença estatística entre os grupos (figura 14D). Da mesma forma, não houve dano hemorrágico no intestino (figura 13I-J), sem diferença estatística nas criptas intestinais (figura 14E). Portanto, a administração oral da GS na dose de 2.000 mg/kg não apresentou efeitos adversos discerníveis nos órgãos vitais de camundongos, demonstrando seu efeito atóxico, efeito também relatado para outras gomas na mesma dose testada (Araújo *et al*., 2020; Ribeiro *et al*., 2023). Nossos achados destacam o potencial uso de arabinogalactanas na indústria nutracêutica e em diversas abordagens biotecnológicas, pois são utilizadas como fibras alimentares e prebióticos (Silva *et al*. 2023), atuando também em distúrbios gastrointestinais (Araújo *et al*., 2015; Araújo *et al*., 2020). Além disso, eles demonstraram efeito imunomodulador (Bovo *et al*., 2016), melhorando o sistema imunológico, e foram relatados por seu efeito antitumoral (Barros *et al*., 2020; Barkeer *et al*., 2024).

CONCLUSÃO

Após o isolamento da GS a partir do exsudato de *S. purpurea* L., obteve-se um pó branco com aspecto amorfo, com rendimento de 51,15%. A caracterização da goma revelou a presença de galactose em sua composição de monossacarídeos, seguida de arabinose, e a presença de ácidos urônicos, glicose, manose, xilose e traços de proteína. Arabinogalactana de alta massa molar, com pequenos traços de proteína e potencial zeta negativo aumentado, possivelmente relacionado aos 16% de ácidos urônicos, ocorrência de ácidos glucurônicos e ácido 4-O-metil glucurônico, evidenciados em RMN. A GS demonstrou um perfil semicristalino amorfizado, com três eventos de degradação. Foi observado seu perfil atóxico nos diferentes modelos *in vitro* testados. Modelos *in vivo* utilizando *G. mellonella* mostraram que a curva de sobrevivência das larvas, reduziu em apenas 6,3% até o sétimo dia de acompanhamento. As análises realizadas durante o período do teste de toxicidade aguda em camundongos mostraram que a dose administrada de 2.000 mg/kg no grupo avaliado não apresentou alterações e sinais tóxicos nos parâmetros de triagem hipocráticos, consumo de água, alimentação, produção de excretas, aspectos fecais, parâmetros bioquímicos, hematológicos, massa média de órgãos e análise histológica. Embora a GS tenha sido isolado e caracterizado em estudos anteriores, destacam-se os avanços nas características físico-químicas e nos testes de toxicidade, realizados em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, que são essenciais para a

ampliação do espectro de aplicações no mesmo. Portanto, nossos achados destacam o potencial uso da GS na indústria nutracêutica e em diferentes abordagens biotecnológicas, devido às suas características e perfil atóxico.

REFERÊNCIAS

Araújo, T. S., Costa, D. S., Sousa, N. A., Souza, L. K., de Araújo, S., Oliveira, A. P., ... & Medeiros, J. V. R. (2015). Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of Anacardium occidentale L. in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, *174*, 299-307.

Araújo, T. S., de Oliveira, T. M., de Sousa, N. A., Souza, L. K., Sousa, F. B., de Oliveira, A. P., ... & Medeiros, J. V. R. (2020). Biopolymer extracted from anadenanthera colubrina (Red angico gum) exerts therapeutic potential in mice: antidiarrheal activity and safety assessment. *Pharmaceuticals*, *13*(1), 17.

Augusto, F., Valente, A. L. P., dos Santos Tada, E., & Rivellino, S. R. (2000). Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, *873*(1), 117-127.

Baethgen, W. E., & Alley, M. M. (1989). A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 20, 961–969.

Balasubramanian, S., Skaf, J., Holzgrabe, U., Bharti, R., Förstner, K. U., Ziebuhr, W., Humeida, U. H., Abdelmohsen, U. R., & Oelschlaeger, T. A. (2018). A new bioactive compound from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SBT348 inhibits Staphylococcal growth and biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1473.

Barbosa, C. E. S. (2014). Avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade antitumoral in vivo do látex e extratos de uma apocynaceae de uso popular. *Vita et Sanitas*, *8*(1), 119-137.

Barros, A. B., Moura, A. F., Silva, D. A., Oliveira, T. M., Barreto, F. S., Ribeiro, W. L. C., ... & Marinho-Filho, J. D. B. (2020). Evaluation of antitumor potential of cashew gum extracted from Anacardium occidentale Linn. *International journal of biological macromolecules*, *154*, 319-328.

Barkeer, S., Pothuraju, R., Malakar, P., Pimentel, T. C., Siddiqui, J. A., & Nair, S. A. (2024). Gum acacia dietary fiber: Significance in immunomodulation, inflammatory diseases, and cancer. *Phytotherapy Research*, 38(3), 1509-1521.

Bashir, S., Teo, Y. Y., Ramesh, S., & Ramesh, K. (2018). Synthesis and characterization of karaya gum-g-poly (acrylic acid) hydrogels and in vitro release of hydrophobic quercetin. *Polymer*, *147*, 108-120.

Bovo, F., Lenzi, R. M., Yamassaki, F. T., Messias-Reason, I. J., Campestrini, L. H., Stevan, F. R., ... & Maurer, J. B. B. (2016). Modulating effects of arabinogalactans from plant gum exudates on human complement system. *Scandinavian Journal of Immunology*, *83*(5), 314-320.

Braz, E. M. A., Silva, S. C. C. C., Brito, C. A. R. S., Carvalho, F. A. A., Alves, M. M. M., Barreto, H. M., ... & Silva-Filho, E. C. (2020). Modified chicha gum by acetylation for antimicrobial and antiparasitic applications: Characterization and biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *160*, 1177-1188.

Brito, A. S. (1994). *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. In Manual de ensaios toxicológicos in vivo (pp. 122-122).

Caceres, A., Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, *30*(1), 55-73.

Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multinanolayered films production. *Carbohydrate polymers*, *85*(3), 522-528.

Ceva-Antunes, P. M., Bizzo, H. R., Silva, A. S., Carvalho, C. P. S., & Antunes, O. A. C. (2006). Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LWT-Food Science and Technology*, 39(4), 437-443.

Chaves, L. S., Oliveira, A. C., Pinho, S. S., Sousa, G. C., Oliveira, A. P., Lopes, A. L., ... & Medeiros, J. V. (2024). Gastroprotective activity and physicochemical analysis of carboxymethylated gum from Anadenanthera colubrina. *International Journal of Biological Macromolecules*, *260*, 129397.

Choi, R., Kim, B. H., Naowaboot, J., Lee, M. Y., Hyun, M. R., Cho, E. J., ... & Chung, C. H. (2011). Effects of ferulic acid on diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes. *Experimental & molecular medicine*, *43*(12), 676-683.

da Silva, G. A., de Brito, N. J. N., & dos Santos, E. C. G. (2014). Gênero Spondias: Aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Biofarm-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, *10*(1), 27-41.

de Almeida, C. L. F., Brito, S. A., de Santana, T. I., Costa, H. B. A., de Carvalho Júnior, C. H. R., da Silva, M. V., ... & da Silva, T. G. (2017). Spondias purpurea L.(Anacardiaceae): antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*(1), 6593073.

de Pinto, G. L., Martinez, M., Mendoza, J. A., Ocando, E., & Rivas, C. (1995). Comparison of three Anacardiaceae gum exudates. *Biochemical systematics and ecology*, 23(2), 151-156.

de Pinto, G. L., Martínez, M., Mendoza, J. A., Avila, D., Ocando, E., & Rivas, C. (1996). Structural study of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea* gum exudate. *Carbohydrate research*, *290*(1), 97-103.

de Sousa, A. K., Ribeiro, F. O., de Oliveira, T. M., de Araujo, A. R., Dias, J. D. N., Albuquerque, P., ... & da Silva, D. A. (2020). Quaternization of angico gum and evaluation of anti-staphylococcal effect and toxicity of their derivatives. *International journal of biological macromolecules*, *150*, 1175-1183.

De Sousa Ferreira, M., Ribeiro, F. D. O. S., Dourado, F. F., de Jesus Oliveira, A. C., Araújo, T. D. S., Brito, L. M., ... & da Silva, D. A. (2023). Production of galactan phthalates derivatives extracted from *Gracilaria birdie*: Characterization, cytotoxic and antioxidant profile. *International Journal of Biological Macromolecules*, 243, 125254.

Dos Santos Ferreira, S. R., Mesquita, M. V. N., de Sá, L. L. F., Nogueira, N. C., dos Santos Rizzo, M., Silva-Filho, E. C., ... & Ribeiro, A. B. (2019). Sustainable natural gums for industrial application: Physiochemical and texturometric evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *54*, 101306.

EC. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, 50.

Ehrenstein, G. W. (2012). *Polymeric materials: structure, properties, applications*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.

Engels, C., Gräter, D., Esquivel, P., Jiménez, V. M., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (Spondias purpurea L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, *46*(2), 557-562.

Feoktistova, L. P., Sapozhnikov, A. N., Aleksandrova, G. P., Medvedeva, S. A., & Grishchenko, L. A. (2002). X-ray Study of Iron-containing Derivatives of Arabinogalactan. *Russian journal of applied chemistry*, *75*, 1911-1915.

Freitas, A. R., Ribeiro, A. J., Ribeiro, A. B., Collado-Gonzalez, M. D. M., Silva, L. R., Alves, L., ... & Silva-Filho, E. C. (2023). Modification of chicha gum: Antibacterial activity, ex vivo mucoadhesion, antioxidant activity and cellular viability. *International Journal of Biological Macromolecules*, *228*, 594-603.

González, F. H. D., & da Silva, S. C. (2017). *Introdução à bioquímica clínica veterinária* (3ª ed.) Porto Alegre: Editora da UFRGS.

Gorshkova, T. A., Kozlova, L. V., & Mikshina, P. V. (2013). Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance. *Biochemistry (Moscow)*, *78*, 836-853.

Gorr, S. U., Flory, C. M., & Schumacher, R. J. (2019). In vivo activity and low toxicity of the second-generation antimicrobial peptide DGL13K. *PloS one*, *14*(5), e0216669.

Guimarães, P. T. C., Pinto, M. C. L., & Melo, M. M. (2011). Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiônico experimental por Tityus fasciolatus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *63*, 1382-1390.

Gu, J., Zhang, H., Yao, H., Zhou, J., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Comparison of characterization, antioxidant and immunological activities of three polysaccharides from *Sagittaria sagittifolia* L. *Carbohydrate polymers*, 235, 115939.

Hoyos, J. (1994). *Frutales en Venezuela: nativos y exóticas* (No. 36). Sociedad de Ciencias Naturales La Salle (pp 33).

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. (2014). Farmacologia Básica e Clínica (12ª ed.) Porto Alegre: AMGH Editora.

Kozioł, M. J., & Macía, M. J. (1998). Chemical composition, nutritional evaluation, and economic prospects of *Spondias purpurea (Anacardiaceae). Economic Botany*, 373-380.

Kuznetsov, B. N., Vasilyeva, N. Y., Levdansky, A. V., Karacharov, A. A., Krylov, A. S., Mazurova, E. V., ... & Kazachenko, A. S. (2017). The Raman spectroscopy, XRD, SEM, and AFM study of arabinogalactan sulfates obtained using sulfamic acid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, *43*, 722-726.

Laine, J. (1994). Surface properties of unbleached kraft pulp fibres determined by different methods.

Lemos, T. L. G., Nogueira, P. C. L., Alencar, J. W., & Craveiro, A. A. (1995). Composition of the leaf oils of four Spondias species from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, *7*(5), 561-563.

Lopes, W. C., Silva-Filho, E. C., Brito, F. D. C., Ribeiro, F. O., Araújo, A. R., Viana, V. G. F., ... & Silva, D. A. (2024). Comparative study of the thermal degradation of angico gum via three non-isothermal methods. *Polymer Bulletin*, *81*(10), 8933-8951.

McCloskey, A. P., Lee, M., Megaw, J., McEvoy, J., Coulter, S. M., Pentlavalli, S., & Laverty, G. (2019). Investigating the In Vivo Antimicrobial Activity of a Self-Assembling Peptide Hydrogel Using a *Galleria mellonella* Infection Model. ACS Omega, 4(2), 2584-2589.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, *65*(1-2), 55-63.

OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. (2002). *In*: OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD iLibrary.

Pieme, C. A., Penlap, V. N., Nkegoum, B., Taziebou, P. C. L., Tekwu, E. M., Etoa, F. X., & Ngongang, J. (2006). Evaluation of acute and subacute toxicities of aqueous ethanolic

extract of leaves of Senna alata (L.) Roxb (Ceasalpiniaceae). *African Journal of Biotechnology*, *5*(3), 283-289.

Pinheiro, H. N., Almeida, J. L. I. O., Veloso, F. F., & da Silva Abreu, F. O. M. (2023). Influence of the reaction conditions on the degree of substitution of carboxymethyl seriguela gum for application as a flocculant aid.

Pires Júnior, H. B., Ferreira Borges, L. M., Dias de Sousa, L. A., Carlos Cunha, L. U. I. Z., de Souza Lino Júnior, R. U. Y., Dos Anjos, M. E. L. O., ... & Pereira, E. (2012). Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. *Ciência Animal Brasileira*, *13*(4), 512-519.

Pitombeira, N. A., Neto, J. G. V., Silva, D. A., Feitosa, J. P., Paula, H. C., & de Paula, R. C. (2015). Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 610-615.

Puri, V., Sharma, A., Kumar, P., Dua, K., Huanbutta, K., Singh, I., & Sangnim, T. (2022). Assessment of Acute Oral Toxicity of Thiolated Gum Ghatti in Rats. *Polymers*, *14*(18), 3836.

Quelemes, P. V., de Araújo, A. R., Plácido, A., Delerue-Matos, C., Maciel, J. S., Bessa, L. J., ... & Leite, J. R. S. (2017). Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. *Carbohydrate polymers*, *157*, 567-575.

Ribeiro, F. D. O. S., de França Dourado, F., Silva, M. F. S., Brito, L. M., Pessoa, C., de Lima, L. R. M., ... & da Silva, D. A. (2020). Anti-proliferative profile of Anacardium occidentale polysaccharide and characterization by AFM. *International journal of biological macromolecules*, 156, 981-987.

Ribeiro, F. D. O. S., de Araújo, G. S., Mendes, M. G. A., Daboit, T. C., Brito, L. M., Pessoa, C., ... & da Silva, D. A. (2020). Structural characterization, antifungal and cytotoxic profiles of quaternized heteropolysaccharide from *Anadenanthera colubrina*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 279-290.

Ribeiro, I. S., Pontes, F. J., Carneiro, M. J., Sousa, N. A., Pinto, V. P., Ribeiro, F. O., ... & de Paula, R. C. (2021). Poly (ε-caprolactone) grafted cashew gum nanoparticles as an epirubicin delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, *179*, 314-323.

Ribeiro, F. D. O. S., de Oliveira, F. D. C. E., Pessoa, C., do Nascimento Dias, J., Albuquerque, P., da Silva Sousa, E., ... & de Almeida, J. R. D. S. (2023). Lemon gum: Non-toxic arabinogalactan isolated from *Citrus* × *latifolia* with antiproliferative property against human prostate adenocarcinoma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 123058.

Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S., & Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of ethnopharmacology*, *141*(3), 860-865.

Sharma, S., Srivastava, D., Grover, S., & Sharma, V. (2014). Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *8*(1), 309.

Silva, A. G. D., Rodrigues, J. F., & Paula, R. C. M. D. (1998). Composição e propriedades reológicas da goma do angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). *Polímeros*, *8*, 34-40.

Silva, D. A., Feitosa, J. P., Maciel, J. S., Paula, H. C., & de Paula, R. C. (2006). Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. *Carbohydrate Polymers*, *66*(1), 16-26.

Silva, S. C. C. C., de Araujo Braz, E. M., de Amorim Carvalho, F. A., de Sousa Brito, C. A. R., Brito, L. M., Barreto, H. M., ... & da Silva, D. A. (2020). Antibacterial and cytotoxic properties from esterified Sterculia gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 606-615.

Silva, F. C. O., Malaisamy, A., Cahú, T. B., de Araújo, M. I. F., Soares, P. A. G., Vieira, A. T., & dos Santos Correia, M. T. (2023). Polysaccharides from exudate gums of plants and interactions with the intestinal microbiota: A review of vegetal biopolymers and prediction of their prebiotic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127715.

Standard, I. (2017). ISO 10993-4: biological evaluation of medical devices part 4—selection of tests for interactions with blood. *International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.*

Teixeira, D. M., Braga, R. C., Horta, A. C., Moreira, R. A., de Brito, A. C., Maciel, J. S., ... & de Paula, R. C. (2007). *Spondias purpurea* Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. *Carbohydrate polymers*, *70*(4), 369-377.

Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. (1999). Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *33*(3), 360-366.

Wang, X., Qu, K., Xu, B., Ren, J., & Qu, X. (2011). Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(8), 2445-2450.

Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963). Acetylation. *Methods in carbohydrate chemistry*, 2(2), 211-215.

ANEXO CAPITULO 2

Anexo 1. Certificado do comitê de ética em pequisa *in vivo*.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Av. São Sebastião, 2819, Parnaíba, Piauí, Brasil; CEP: 64202-020.
Telefone (86) 3323-5251, E-mail: ceua.ufdpar@gmail.com
Site: http://ufpi.br/ceua-comissao-de-etica-no-uso-de-animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação Toxicológica e Efeito Gastroprotetor da Goma Extraída do Exsudato da Seriguela (*Spondias purpúrea* L.), uma Arabinogalactana com Potencial Biotecnológico**", registrada sob protocolo Nº **002/2021**, de a responsabilidade do **Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros** do **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** da **Universidade Federal do Delta do Parnaíba/UFDPar,** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica e/ou Ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi ***APROVADO*** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (CEUA/UFDPar), em Reunião na presente data **09/04/2021**.

Finalidade	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência da Autorização	Maio/ 2021 a junho/ 2024
Espécie/Linhagem/raça:	*Mus musculus* /Camundongo isogênico/ Balb/c
Nº de Animais:	124
Peso/ Idade:	25-30g, 4 semanas
Sexo:	Machos: 48; Fêmeas: 76
Origem:	Biotério da Universidade Federal do Delta do Parnaíba-UFDPar

Parnaíba, 09 de abril de 2021.

Jefferson Soares de Oliveira

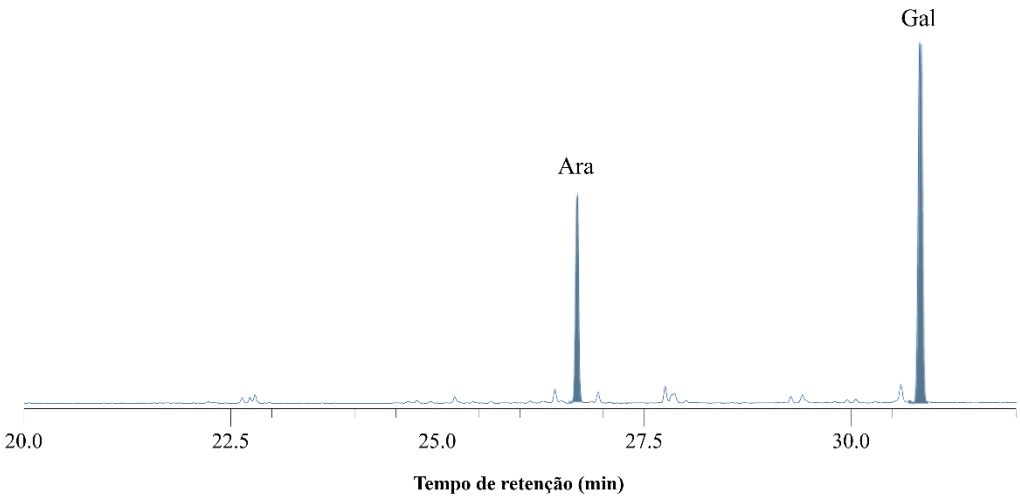
Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Coordenador da CEUA/UFDPar

Para verificar a autenticidade deste documento acesse o site https://ufpi.br/ceua-comissao-de-etica-no-uso-de-animais e procure os dados do projeto no arquivo disponível em "Acesse aqui a lista de Projetos Aprovados pela **CEUA/UFDPar***"*

Anexo 2. Exsudato solubilizado de *Spondias purpurea*.



Anexo 3. Cromatograma obtigo por GC-MS para a GS hidrolisada.



Anexo 3. Triagem hipocrática: parâmetros obtidos após administração oral única de 2.000 mg/kg da GS em camundongos Balb/c. O controle recebeu apenas solução salina 0,9% por gavagem. Os parâmetros foram pontuados 4: normal; 3: ligeiramente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; e 0: ausente. Os resultados são expressos em média aritmética.

	Parâmetros	**Grupos (n = 5)**	**Tempo (h)**					**Tempo (dias)**			
			0,25	0,5	1	2	24	3	7	10	14
Estado Consciente e Disposição	Atividade Geral	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Atividade e Coordenação Sistema Motor e Tônus Muscular	Resposta ao toque	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Pegada de cauda	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Alisamento	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Tônus corporal	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Força de agarrar	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Reflexões	Reflexo corneano	SAL	4	4	3	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sistema nervoso central (NSC)	Tremores	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Convulsões	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Contorção	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Straub	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema nervoso autônomo (NSA)	Lacrimejamento	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Piloereção	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Respiração	SAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		GS	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Constipação intestinal	SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalidade		SAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		GS	0	0	0	0	0	0	0	0	0