



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

REGIA KAREN BARBOSA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
BIOMEMBRANA DE GALACTOMANANA E EXTRATO BRUTO DE *Allium
sativum* COM POTENCIAL EFEITO MODULADOR DA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA – CE

2024

REGIA KAREN BARBOSA DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
BIOMEMBRANA DE GALACTOMANANA E EXTRATO BRUTO DE *Allium*
sativum COM POTENCIAL EFEITO MODULADOR DA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS EM CAMUNDONGOS

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

S235

Souza, Regia.

Desenvolvimento e caracterização físico-química de biomembrana de galactomanana e extrato bruto de *allium sativum* com potencial efeito modulador da cicatrização de feridas em camundongos / Regia Souza. – 2024.

98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Cicatrização. 2. Galactomanana. 3. *Allium sativum*. 4. Feridas. I. Título.

615.1

CDD

REGIA KAREN BARBOSA DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
BIOMEMBRANA DE GALACTOMANANA E EXTRATO BRUTO DE *Allium
sativum* COM POTENCIAL EFEITO MODULADOR DA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS EM CAMUNDONGOS

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como requisito
para a obtenção do título de mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes
de Alencar

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar – UFC (Orientadora)

Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa – UFC

Dr. Ed Carlos Moraes dos Santos – UniAteneu

Dra. Mirele da Silveira Vasconcelos – IFCE

À Deus.

Aos meus pais.

Aos meus irmãos.

Aos meus amigos.

Vocês estarão sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a bolsa de auxílio que me permitiu concluir essa jornada.

À minha família, aos meus pais por todo amor e por sempre apoiarem as minhas decisões e por nos ensinarem desde sempre que a educação é sempre o melhor caminho, obrigada por tudo, aos meus irmãos, Carlos Filho, Guilherme, Leonardo e Henzo pela parceria de uma vida toda. Esse diploma é tão meu quanto de vocês.

Ao professor Dr. Ed Carlos Morais dos Santos, meu orientador desde sempre. Muito obrigada por ter me apresentado à ciência, por me guiar nesse caminho que não é fácil, por ter me acompanhado desde o terceiro semestre da faculdade até o final dessa pesquisa, obrigada por todos os ensinamentos, por acreditar em mim quando eu mesma não fui capaz, por superar comigo todas as adversidades, e não foram poucas, chegar até aqui só foi possível porque você fez muito mais que orientar. Você será para sempre o meu mentor.

Aos professores participantes da banca de qualificação e defesa, Dra. Tamiries Goebel, Dr. Kirley Canuto, Dra. Daniele Sousa e Dra. Mirele Vasconcelos, pela disponibilidade do aceite e por suas valiosas considerações que foram essenciais na melhoria deste trabalho.

À todos os funcionários do biotério do NPDM, em especial a querida veterinária Gabriela, por toda ajuda, paciência e escuta. Sem vocês eu não teria conseguido.

Fazer ciência no Brasil não é fácil, mas esse caminho torna-se mais leve e suportável por causa das amizades e pessoas que conhecemos. Obrigada ao Vicente, por ter sido esse grande achado na minha vida e por ser esse amigo tão incrível e parceiro da vida, você assinou um contrato comigo para todo o sempre. .

Aos meus queridos amigos que a disciplina de bioestatística uniu, Jean, Victor, Morgana e Patrick, obrigada por todas as saídas, momentos de descontração, conselhos e desabafos, vocês foram fundamentais.

Ao meu parceiro de laboratório e amigo para vida toda, Landerson, só nós sabemos tudo que passamos nesse percurso e chegar até aqui só foi possível porque tínhamos um ao outro sempre, sei que a nossa jornada adiante será incrível.

Ao meu grande amigo que a bioquímica trouxe, Sávio, por toda ajuda, por todas as conversas e conselhos, por toda parceria, não estamos geograficamente juntos porque você está trilhando um caminho incrível, mas a parceria continua a mesma.

Aos meus amigos do laboratório que me mostraram que a ciência e a rotina podem ser muito divertidas e que pessoas incríveis ainda existem nesse meio, Rigoberto, Caio, Gabriela e Mateus obrigada por todo apoio, por toda ajuda, sem vocês eu não teria conseguido.

À minha orientadora, Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, por ter me recebido em seu laboratório e aceitado me orientar em um período não convencional, obrigada por todo suporte à minha pesquisa que me permitiu conseguir o título.

Por fim e não menos importante, a todos que compõem o Laboratório de Farmacologia Bioquímica, em especial ao Manuel e a Profa. Marisa Canuto, pela recepção e ajuda sempre que precisei.

“No trabalho de pesquisa como eu
concebo, muitas vezes é necessário se
sentir burro, incapaz, incompetente,
idiota”

Pierre Bourdieu

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BIOMEMBRANA DE GALACTOMANANA E EXTRATO BRUTO DE *Allium sativum* COM POTENCIAL EFEITO MODULADOR DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS

Feridas são um problema de saúde pública que geram um grande impacto socioeconômico e novos estudos que busquem auxiliar as abordagens terapêuticas já existentes se faz essencial. Levando em consideração que o uso de plantas para fins medicinais é uma prática que atravessa milênios e muito bem difundida pela população, este estudo objetiva o desenvolvimento e caracterização físico-química de biomembranas de galactomanana e extrato bruto de *Allium sativum* com potencial efeito modulador da inflamação e estresse oxidativo em modelo de ferida excisional em camundongos. O extrato foi avaliado para a quantificação de proteínas, carboidratos, compostos fenólicos, determinação de massa seca e umidade, identificação de metabólitos secundários e análise do perfil metabolômico. As biomembranas foram avaliadas quanto a sua capacidade de inchaço, permeabilidade ao vapor de água e ensaio de compatibilidade sanguínea. Para avaliação da modulação da atividade anti-inflamatória e estresse oxidativo foi realizada a ferida excisional em camundongos swiss, fêmeas, divididos em quatro grupos experimentais: Sham (grupo sem tratamento), biomem17%, biomem26% e Veic (biomembrana sem extrato). Os animais foram eutanasiados após 2, 7 e 14 dias. No 2º dia foram analisados níveis de e TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF, GSH e MDA. Nos dias 7 e 14 as amostras foram dosadas para VEGF. O extrato apresentou um teor de 0,570 \pm 0,020 mg/mL de proteínas, 192,642 \pm 4,541 mg/mL de carboidratos, 43,32 \pm 3,97 mg GAE/g, 67,68 \pm 0,2% de umidade e 32,32 \pm 0,2% de massa seca. Os testes de metabólitos secundários identificaram a presença de cumarinas, taninos condensados, terpenóides e esteróides. Na análise metabolômica foi possível identificar 55 metabólitos. A capacidade de inchaço entre as biomembranas foi avaliada e não houve diferença entre as biomembranas carregadas com extrato ou não, diferentemente do estudo de permeabilidade ao vapor de água que a biomembrana sem extrato teve maior capacidade de permeabilidade. Todas as biomembranas são hemocompatíveis. No ensaio de DPPH e ABTS+ todas as soluções filmogênicas e o extrato apresentam elevada atividade antioxidante, sendo a biomem17% a que demonstrou CI₅₀ mais efetiva. Os tratamentos

com as biomembranas (17 e 26%) também foram capazes de diminuir os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e elevar os níveis de IL-10 no 2º dia de tratamento. Na análise de fatores de crescimento, a biomem26% elevou os níveis de VEGF, no 7º dia os níveis foram mantidos e a biomem17% foi a que apresentou maior aumento. No 14º os níveis se mantiveram e não houve diferença entre os grupos. Na avaliação da atividade antioxidante, os dois tratamentos elevaram os níveis de GSH e reduziram os níveis de MDA no 2º dia de tratamento e somente a biomem17% conseguiu manter o efeito protetor contra peroxidação lipídica. Em suma, as biomembranas apresentaram importante efeito anti-inflamatório e antioxidante e espera-se esses efeitos auxiliem no processo de cicatrização.

Palavras-chave: Cicatrização; Galactomanana; *Allium sativum*; Feridas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF GALACTOMANNAN BIOMEMBRANE AND CRUDE *Allium sativum* EXTRACT WITH POTENTIAL MODULATING EFFECT ON WOUND HEALING IN MICE

Wounds are a public health issue that generate a significant socioeconomic impact, and new studies aimed at assisting existing therapeutic approaches are essential. Considering that the use of plants for medicinal purposes is a practice that spans millennia and is widely disseminated among the population, this study aims at the development and physicochemical characterization of galactomannan biomembranes and crude *Allium sativum* extract with potential modulating effect on inflammation and oxidative stress in an excisional wound model in mice. The extract was evaluated for protein, carbohydrate, phenolic compounds quantification, determination of dry mass and moisture, identification of secondary metabolites, and metabolomic profile analysis. The biomembranes were assessed for their swelling capacity, water vapor permeability, and blood compatibility assay. For the evaluation of the modulation of anti-inflammatory activity and oxidative stress, an excisional wound was made in Swiss female mice, divided into four experimental groups: Sham (untreated group), biomem21%, biomem35%, and Veic (biomembrane without extract). The animals were euthanized after 2, 7, and 14 days. On the 2nd day, levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, VEGF, GSH, and MDA were analyzed. On days 7 and 14, samples were dosed for VEGF. The extract showed a content of 0.570 ± 0.020 mg/mL of proteins, 192.642 ± 4.541 mg/mL of carbohydrates, $43,32\pm 3,97$ mg GAE/g, $67.68\pm 0.2\%$ moisture, and $32.32\pm 0.2\%$ dry mass. The secondary metabolite tests identified the presence of coumarins, condensed tannins, terpenoids, and steroids. In the metabolomic analysis, it was possible to identify 55 metabolites. The swelling capacity among the biomembranes was evaluated, and there was no difference between biomembranes loaded with or without extract, unlike the water vapor permeability study where the biomembrane without extract had a higher

permeability capacity. All biomembranes are hemocompatible. In the DPPH and ABTS+ assay, all filmogenic solutions and the extract possess high antioxidant activity, with biomem21% showing the most effective IC50. The treatments with the biomembranes (21 and 35%) were also able to decrease levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and increase levels of IL-10 on the 2nd day of treatment. In the growth factor analysis, biomem35% raised VEGF levels, on the 7th day the levels were maintained, and biomem21% showed the greatest increase. On the 14th day, the levels remained and there was no difference between the groups. In the evaluation of antioxidant activity, both treatments raised GSH levels and reduced MDA levels on the 2nd day of treatment, and only biomem21% was able to maintain the protective effect against lipid peroxidation. In summary, the biomembranes showed an important anti-inflammatory and antioxidant effect, and these effects are expected to assist in the healing process.

Keywords: Wound healing; Galactomannan; *Allium sativum*; Wounds.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CORTE TRANSVERSAL DA PELE.....	20
FIGURA 2 - FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS COM CÉLULAS ENVOLVIDAS	23
FIGURA 3 - ESTRUTURA CLÁSSICA DAS GALACTOMANANAS	28
FIGURA 4 - APLICAÇÕES TESTADAS PARA GALACTOMANANAS BRASILEIRAS.....	29
FIGURA 5 - FLORES, FRUTOS E ÁRVORE DE CAESALPINIA PULCHERRIMA.....	30
FIGURA 6 - LISTA E ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS CONTENDO ENXOFRE ISOLADOS DE A. SATIVUM	32
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO ESTUDO	51
FIGURA 8 - RESULTADO DOS TESTES DE BIURETO E HELLER NO EXTRATO BRUTO DE A. SATIVUM E SOLUÇÃO DE GALACTOMANANA	55
FIGURA 9 - CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0 A 200 MG/L VERSUS AS ABSORBÂNCIAS LIDAS A 725 NM.....	58
FIGURA 10 -CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE UMIDADE DA BIOMEMGALACTOAS	62
FIGURA 13 - PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DA BIOMEMGALACTOAS	64
FIGURA 14 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA BIOMEMGALACTOAS	64
FIGURA 15 - EFEITO DA BIOMEMGALACTOAS SOBRE OS NÍVEIS DE TNF- α , IL-1 β E IL-6 E IL-10.....	66
FIGURA 16 - EFEITO DA BIOMEMGALACTOAS SOBRE OS NÍVEIS DE VEGF	68
FIGURA 17 - EFEITO DA BIOMEMGALACTOAS SOBRE OS NÍVEIS DE GSH.....	69
FIGURA 18 - EFEITO DA BIOMEMGALACTOAS SOBRE OS NÍVEIS DE MDA	69
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA.....	98

LISTA DE QUADRO E TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DAS BIOMEMBRANAS.....	45
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO BRUTO DE A. SATIVUM.	59
TABELA 3 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE METABOLÔMICA DO EXTRATO BRUTO DE A. SATIVUM	59
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH E ABTS ...	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)

BSA – Albumina sérica bovina

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB – Reagente de Ellman, 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etilenodiamino

EGF – Fator de crescimento da epiderme

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

GAE – Equivalentes de ácido gálico

GSH – Glutathiona reduzida

IL – Interleucina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MDA – Malondialdeído

MEC – Matriz extra celular

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato de sódio

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PRPC – Polissacarídeos de reserva de parede celular

SBF – Solução simuladora de fluido corpóreo

SPF – Livre de patógenos conhecidos

SUS – Sistema Único de Saúde

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF – Fator de crescimento transformador

TNF – Fator de necrose tumoral

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	1 INTRODUÇÃO	20
1.1	GALACTOMANANAS.....	20
1.2	CAESALPINIA PULCHERRIMA	29
1.3	ALLIUM SATIVUM	31
1.4	CONSTITUIÇÃO DA PELE.....	20
1.5	O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	22
1.6	ESTRESSE OXIDATIVO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA MODULAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO	25
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	METODOLOGIA.....	38
4.1	MATERIAIS VEGETAIS	38
4.2	EXTRAÇÃO DE GALACTOMANANA DAS SEMENTES DE <i>CAESALPINIA</i> <i>PULCHERRIMA</i>	38
4.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>ALLIUM SATIVUM</i>	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>ALLIUM SATIVUM</i>	39
4.4.1	<i>Quantificação de proteínas</i>	39
4.4.2	<i>Quantificação de carboidratos</i>	40
4.4.3	<i>Determinação de massa seca e umidade</i>	41
4.4.4	<i>Quantificação de compostos fenólicos</i>	41
4.4.5	<i>Identificação de metabólitos secundários</i>	42
4.4.6	<i>Análise Metabolômica do extrato de Allium sativum através de</i> <i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometro de Massas</i>	43

4.5	ELABORAÇÃO DA BIOMEMBRANA DE GALACTOMANANA DE <i>C. PULCHERRIMA</i> E <i>ALLIUM SATIVUM</i> (BIOMEMGALACTOAS).....	44
4.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMEMGALACTOAS.....	45
4.6.1	<i>Determinação da concentração de galactomanana por massa seca</i> 46	
4.6.2	<i>Estudos de absorção de umidade</i>	46
4.6.3	<i>Estudo de permeabilidade ao vapor de água</i>	47
4.6.4	<i>Ensaio de atividade hemolítica</i>	47
4.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	48
4.7.1	<i>DPPH e ABTS</i>	48
4.8	MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDA EXCISIONAL	49
4.8.1	<i>Animais</i>	49
4.8.2	<i>Aspectos éticos</i>	49
4.8.3	<i>Indução de ferida excisional</i>	50
4.8.4	<i>Definição dos grupos experimentais</i>	51
4.8.5	<i>Obtenção das amostras teciduais</i>	52
4.8.6	<i>Quantificação dos níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e VEGF</i>	52
4.8.7	<i>Avaliação do estresse oxidativo</i>	53
4.8.7.1	Quantificação dos níveis de MDA (malondialdeído).....	53
4.8.7.2	Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH).....	53
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5	RESULTADOS	55
5.1	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>ALLIUM SATIVUM</i>	55
5.1.1	<i>Proteínas</i>	55
5.1.2	<i>Carboidratos</i>	56
5.1.3	<i>Massa seca e umidade</i>	57
5.1.4	<i>Compostos fenólicos</i>	57
5.1.5	<i>Metabólitos secundários</i>	58
5.1.6	<i>Análise metabolômica do extrato bruto de A. sativum</i>	59
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMEMBRANA.....	61
5.2.1	<i>Determinação da concentração de galactomanana por massa seca</i> 61	

5.2.2	<i>Estudos de absorção de umidade</i>	62
5.2.3	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	63
5.2.4	<i>Atividade hemolítica</i>	64
5.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	65
5.3.1	<i>ABTS e DPPH</i>	65
5.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	66
5.4.1	<i>Quantificação de citocinas inflamatórias</i>	66
5.4.2	<i>Fatores de crescimento</i>	67
5.4.3	<i>Estresse oxidativo</i>	69
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO I	93
	ANEXO II	97

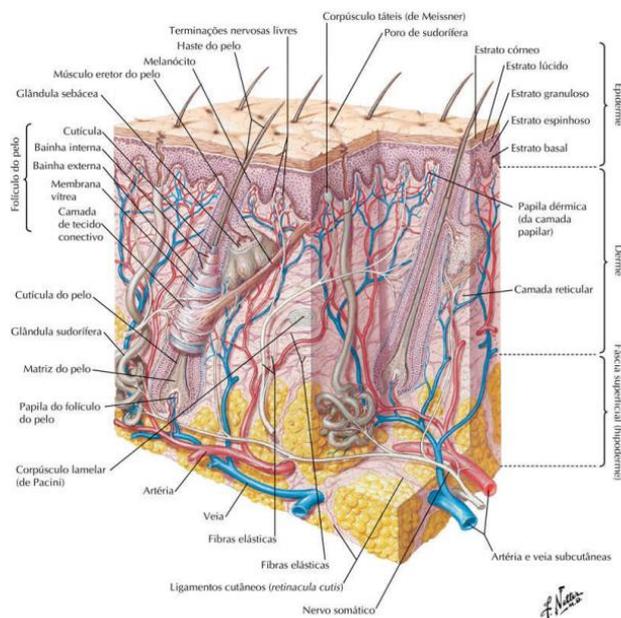
1 1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSTITUIÇÃO DA PELE

A pele é considerada como maior órgão, recobrindo todo o corpo humano, corresponde a 16% do peso corporal. Devido a sua estrutura tem a capacidade de proteger o organismo contra desidratação, atrito, agentes químicos e patógenos além de colaborar com a termorregulação (Junqueira e Carneiro, 2018).

Ela é constituída por um tecido epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e um tecido conjuntivo de origem mesodérmica, a derme, abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não faz parte da pele, mas faz a função de uni-la com os órgãos adjacentes (figura 5) (Junqueira e Carneiro, 2018).

Figura 1 - Corte transversal da pele



Fonte: Netter, 2021.

Epiderme

A epiderme constitui a camada mais externa da pele, sua espessura distingue-se entre espessa e fina, sendo a parte espessa encontrada na palma das mãos e

planta dos pés e recobrimdo algumas articulações e a parte fina protegendo o restante do corpo, é a barreira física que separa os órgãos internos do ambiente, dividida em subcamadas tais como camada córnea, granular, basal, clara e espinhosa (Fuchs, 2008; Arda *et al.*, 2014).

Sua composição celular é feita principalmente por queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina, uma proteína importante para a resistência e impermeabilização da pele, mas também abriga melanócitos, células que produzem melanina que define a cor da pele e protege contra raios ultravioletas. Ela passa por um processo de renovação celular constante, fundamental para manutenção da integridade e função da pele, onde as células se originam na camada basal e se deslocam em direção a superfície antes de se descamarem (Thibodeau e Patton, 2020; Proks *et al.*, 2008).

Derme

Localizada mais abaixo da epiderme, é o tecido que une a pele ao tecido subcutâneo, é essencial à epiderme que por não possuir vasos sanguíneos não consegue nutrir-se sozinha, além de ser importante para termorregulação, percepção sensorial e defesa imunológica. É constituída por duas camadas pouco delimitadas, a superficial (papilar) e a mais profunda (reticular) (Junqueira e Carneiro, 2018).

Na camada papilar há a formação das papilas dérmicas onde estão inseridas fibrilas de colágeno tipo III que estão inseridas tanto na membrana basal quanto na parte mais profunda da derme prendendo-a à epiderme e conferindo sua resistência e elasticidade. Os vasos sanguíneos presentes são responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme (Farage *et al.*, 2009; James *et al.*, 2016).

A camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso, fibras de colágeno do tipo I e II e vasos sanguíneos mais calibrosos, vasos linfáticos e nervos (Arda *et al.*, 2014). Nessa camada também são encontradas estruturas derivadas da derme como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, células como fibroblastos, mastócitos, e macrófagos são classificadas como residentes, e neutrófilos, linfócitos e monócitos são transitórias extravasando para o tecido quando há reação inflamatória em resposta ao trauma ou infecção (Edwards, 2005; Zouboulis *et al.*, 2009).

Tecido celular subcutâneo (Hipoderme)

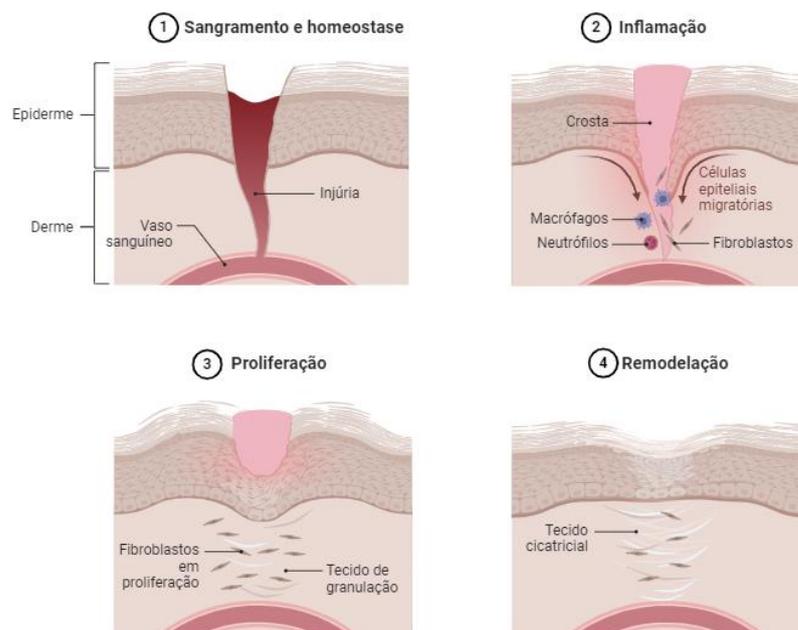
É a camada mais profunda responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas em que ela se apoia, formada principalmente por tecido adiposo, localizado entre a derme e a camada muscular, constitui uma reserva energética, participa da síntese hormonal, protege o corpo da perda de calor e protege os órgãos internos de traumas tanto térmicos quanto mecânicos (Baranoski, Ayello, 2004; Edwards, 2005).

1.2 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Um fenômeno comum aos organismos vivos é a sua capacidade de regeneração, nos seres unicelulares está restrita à presença de enzimas e de moléculas de alta complexidade como RNAs e DNA, já nos organismos pluricelulares além destes, o reparo pode ocorrer pela regeneração ou pela cicatrização, onde no primeiro dá-se pela recomposição da atividade tecidual e no segundo há o reestabelecimento da homeostasia tecidual com perda de função e formação de cicatriz fibrótica (Balbino *et al.*, 2005).

As feridas resultam de um rompimento da integridade cutânea que pode afetar a fisiologia da pele, especialmente quando acometem a camada dérmica, de modo que o processo de cicatrização, que tem por finalidade a cura das feridas, é dinâmico, incluindo vários níveis de organização temporal e funcional envolvendo a interação de células, fatores de crescimento e citocinas e é dividido em quatro fases que se sobrepõem: homeostase, inflamação, proliferação e de remodelação (Figura 2) (Laureano e Rodrigues, 2011; Isaac *et al.*, 2010).

Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas com células envolvidas



Fonte: Autor, 2024.

A homeostase é iniciada imediatamente após a injúria, ocorrendo constrição vascular e formação do coágulo de fibrina que vão liberar citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento transformador (TGF)- β , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento da epiderme (EGF) (Leal e Carvalho, 2014).

A fase inflamatória inicia-se logo após o controle da hemorragia, com a formação da cascata de coagulação. Com o coágulo formado estabelecendo uma barreira de proteção há liberação local de histamina, bradicinina e serotonina que vão aumentar o fluxo sanguíneo através de vaso dilatação, conseqüentemente gerando os primeiros sinais de inflamação como calor e rubor. Em seguida as células inflamatórias migram para o local da ferida causando uma infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Tazima *et al.*, 2008; Leal e Carvalho, 2014).

Na fase proliferativa há o predomínio dos mecanismos celulares que permitem a reepitelização, angiogênese e fibroplasia (Laureano e Rodrigues, 2011). Essa fase é a responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita, inicia-se horas após a lesão por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo TGF- β e EGF. Com a presença de macrófagos no local da lesão e os mediadores químicos produzidos por eles intensifica-se a migração e ativação de fibroblastos oriundos dos tecidos

adjacentes (Balbino *et al.*, 2005). Nessa fase há o aumento da permeabilidade vascular juntamente com a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, esses novos vasos vão nutrir e suprir de oxigênio para tecido de granulação formado até que ele preencha o fundo e as bordas da ferida (Mendonça e Coutinho-Netto, 2009).

A organização estrutural da pele pode ser explicada por dois modelos: deslizantes e rolantes. No primeiro modelo os queratinócitos da camada basal passam por modificações em suas articulações de ancoragem que vão permitir que eles se desloquem e migrem da lateral para o núcleo da lesão. Já no modelo de rolamento, os queratinócitos sofrem uma modificação morfológica e funcional que, juntamente com os desmossomos, faz com que rolem em direção aos queratinócitos basais que estão ancorados na membrana basal. A regeneração da membrana basal conduz à proliferação dos queratinócitos e sua diferenciação vertical, restaurando assim as características fisiológicas do tecido epitelial (Tottoli *et al.*, 2020; Usui *et al.*, 2005).

A fase de remodelação consiste na deposição de novos elementos da matriz extra celular (MEC) e a sua alteração com o tempo que ocorre durante todo o processo de cicatrização a medida em que o coágulo de fibrina é substituído pelo tecido de granulação (Laureano e Rodrigues, 2011). À medida que o tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno tipo III, a ferida começa a adquirir aparência de massa fibrótica caracterizando a cicatriz (Balbino *et al.*, 2005). O equilíbrio entre a síntese e degradação de colágeno busca restaurar a estrutura tecidual o mais próximo do original (Isaac *et al.*, 2010). Inicialmente há um predomínio do colágeno tipo III, porém com o decorrer do tempo e ação do TGF- β que estimula maior secreção do colágeno tipo I (predominante na pele não lesionada) e sua menor degradação, esse colágeno tipo III vai sendo substituído pelo I ocorrendo juntamente uma mudança em sua organização, a qual muda de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para fibras entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de *stress* (Isaac *et al.*, 2010).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA MODULAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO

Como já exposto no tópico anterior, a cicatrização é um processo complexo e multifatorial, que envolve uma sequência coordenada de eventos celulares e moleculares, como a inflamação, a neoformação e a remodelação tecidual. O estresse oxidativo e a atividade inflamatória são componentes críticos que desempenham papéis fundamentais nesse processo, influenciando tanto a eficiência quanto a qualidade da cicatrização (Laureano e Rodrigues, 2011; Balbino *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do sistema biológico de detoxificar os reativos intermediários ou reparar o dano resultante. Na fase inicial da cicatrização, as EROs são geradas em grandes quantidades pelos leucócitos e outras células no local da lesão, desempenhando um papel duplo, que deve ser finamente regulado, pois ao mesmo tempo que essas moléculas são essenciais para a defesa contra patógenos e para a sinalização celular que promove a reparação tecidual, por outro lado, quando em excesso, podem causar dano tecidual adicional, retardando o processo de cicatrização (Sen *et al.*, 2009; Dunnill *et al.*, 2017).

A atividade inflamatória é uma resposta natural à lesão, caracterizada pela ativação de células imunes, a produção de mediadores inflamatórios, e o recrutamento de células para o local da ferida. Esses mediadores inflamatórios desempenham papel fundamental no processo de cicatrização, atuando desde a liberação imediata de substâncias pro-inflamatórias como citocinas (IL-1, TNF- α) e quimiocinas promovendo a chegada de células imunes, incluindo neutrófilos e macrófagos, ao local da ferida. Esta fase inflamatória é crucial para preparar o leito da ferida para a subsequente formação de novo tecido (Martin, 1997; Eming *et al.*, 2014).

A interação entre o estresse oxidativo e a inflamação é uma via de mão dupla, onde o estresse oxidativo pode exacerbar a inflamação e vice-versa. As EROs podem ativar fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que promove a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, enquanto os mediadores

inflamatórios podem estimular as células a produzir mais EROs (Liu *et al.*, 2014; Gorenkova *et al.*, 2013).

À medida que a cicatrização avança, os mediadores inflamatórios ajudam a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização. Os macrófagos, em particular, desempenham um papel duplo: inicialmente contribuem para a resposta inflamatória e, posteriormente, facilitam a reparação tecidual e a angiogênese através da liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes fatores são fundamentais para estimular a proliferação e migração de fibroblastos e células endoteliais, respectivamente, promovendo a formação de tecido granuloso e a neovascularização no local da ferida. Assim, a resolução da inflamação não marca o fim do papel dos mediadores inflamatórios, mas sim uma transição para funções que apoiam a regeneração e a remodelação tecidual (Singer e Clark, 1999; Werner e Grose, 2003).

Intervenções que modulam o estresse oxidativo e a atividade inflamatória têm mostrado promessa na melhoria da cicatrização de feridas. Antioxidantes, por exemplo, podem reduzir o dano causado pelas EROs e melhorar os resultados da cicatrização, enquanto agentes anti-inflamatórios podem mitigar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória prolongada (Gill & Parks, 2014; Zhao *et al.*, 2016).

Portanto, a compreensão da relação entre estresse oxidativo, atividade inflamatória e cicatrização de feridas é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem otimizar o processo de reparação tecidual. A manipulação desses processos biológicos oferece um caminho promissor para melhorar a eficácia da cicatrização de feridas em várias condições patológicas (Witte & Barbul, 2012; Tandara & Mustoe, 2004).

1.4 GALACTOMANANAS

Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) são classificados quanto a sua estrutura química em três grupos distintos: mananos, xiloglucanos e

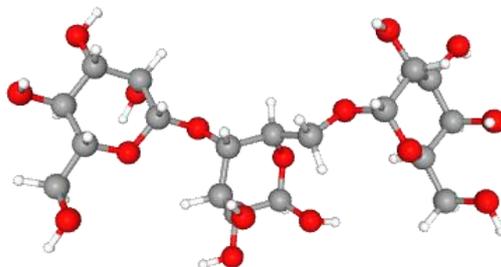
galactanos, sendo os mananos subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos (Buckeridge *et al.*, 2000).

As galactomananas são encontradas principalmente em leguminosas, as sementes produtoras desse PRPC são constituídas de tegumento ou casca, embrião e endosperma do tipo mucilaginoso que o envolve, podendo ser completamente extraída a partir do endosperma isolado ou do tecido de sementes com água quente. (Patel e Goyal, 2012).

Elas não apenas desempenham o papel de reserva, mas também exercem influência sobre o fluxo de água devido à sua maior solubilidade nos estágios iniciais de germinação, tendo sua relação estrutura-função definida pelo grau de ramificação dos mananos, quanto menos ramificado, maior sua relação com a dureza e proteção do embrião, da mesma forma que quanto maior a ramificação, mais solúvel será o polissacarídeo e maior a sua participação nas funções hídricas (Buckeridge *et al.*, 2000).

Esses polissacarídeos são estruturalmente compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas β -(1-4), à qual substituições de galactose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1-6) como mostra a figura 1. A razão manose:galactose (M/G) e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia é utilizada como parâmetro para distinguir as subfamílias de leguminosas onde as galactomananas estão presentes (Dea e Morrison, 1975; Sharma *et al.*, 2022).

Figura 3 - Estrutura clássica das galactomananas



Estrutura clássica das galactomananas []n

Fonte: PubChem, 2024.

A razão M/G também é determinante para o estabelecimento de uma relação entre a estrutura do polímero e as suas propriedades quando em solução, principalmente no que se refere a sua capacidade solubilização, como na galactomanana de goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) com razão M/G de 3,5:1 apresentando baixa solubilidade em água a temperatura ambiente quando comparada com a galactomanana de goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) que possui razão M/G de 1,8:1 (Dea, Morrison, 1975; Patel e Goyal, 2012).

As galactomananas podem interagir com diversos materiais poliméricos, tais como outros polissacarídeos, proteínas e amidos, promovendo modificações em suas propriedades, gerando efeitos sinérgicos que amplificam a viscosidade, induzem gelificação, promovem separação de fases e desencadeiam outros efeitos físico-químicos (Cui *et al.*, 2006).

Todas essas características tornam esse polissacarídeo objeto de grande importância tanto do ponto de vista acadêmico quanto farmacêutico/industrial. Seu uso já foi investigado para aumento do tempo de prateleira de frutos e leguminosas, uso como espessante, na encapsulação de ativos, na forma de géis com atividades biológicas e

cosméticas e outros listados na figura 2 (Santos, 2012; Souza *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2020).

Figura 4 - Aplicações testadas para galactomananas brasileiras

Origem	Aplicações
<i>Mimosa scabrella</i>	Formulações de xampu, pudim Matriz cromatográfica para isol. de lectina Matriz para liberação de fármaco Antiviral: febre amarela
<i>Adenantha pavonina</i>	Filmes Liberação de fármaco
<i>Leucena leucocephala</i>	Micropropagação plantas Filmes finos Absorção de albumina Antiviral: febre amarela
<i>Dimorphandra mollis</i>	Aditivo na produção de papel
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Meio de cultura de fungos Filmes finos Filmes para revestimento de frutos
<i>Schizolobium parahybum</i>	Matriz cromatográfica para isol. de lectina
<i>Cassia fastuosa</i>	Matriz cromatográfica para isol. de lectina Micropropagação de plantas
<i>Cassia siliqua</i>	Liberação controlada de genes

Fonte: Cunha *et al.*, 2009.

1.5 CAESALPINIA PULCHERRIMA

Caesalpinia pulcherrima (*C. pulcherrima*), tradicionalmente conhecida como flor de pavão, orgulho de barbados ou flamboianzinho, é uma planta da família *Fabaceae*, tradicional na medicina indígena. Um arbusto perene que cresce até três metros de altura, suas folhas vão de 20 a 40 cm de comprimento, bipinadas, suas flores tem cinco pétalas que podem ser laranjas, amarelas ou vermelhas. O fruto é uma vagem de 6 a 12 cm de comprimento (Deepika *et al.*, 2020).

É considerada como planta nativa da Ásia e introduzida nas Índias Ocidentais e regiões tropicais de todo mundo devido a beleza de suas flores marcantes e coloridas. É considerada erva daninha na África Central e no sul da Flórida, nas Antilhas Holandesas é conhecida como espécie invasora, porém é amplamente cultivada e naturalizada em muitas partes dos trópicos (Datiles e Acevedo-Rodriguez, 2014).

Figura 5 - Flores, frutos e árvore de *Caesalpinia pulcherrima*



A: Frutos (vagem), B: Flores, C: Árvore.

Fonte: Autor, 2024.

Seu uso medicinal é vasto, um estudo feito por Pankaj e colaboradores (2011) que revisa os aspectos farmacológicos da planta mostrou que ela é usada para várias doenças, como febre, úlceras, no tratamento de feridas, é considerada adstringente e sedativa além dos seus efeitos antioxidantes, antidiabéticos e antimicrobianos.

Outro estudo também demonstrou atividade antiviral de amplo espectro do extrato aquoso de *C. pulcherrima* contra adenovírus e herpesvírus (Chiang *et al.*, 2003). Flavonóides isolados das partes aéreas da planta demonstraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* entre outras bactérias e atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (Srinivas *et al.*, 2003).

O componente mais investigado da semente foi o endosperma. Azero e Andrade (2002), Andrade e colegas (1999), Chowdhury e Chatterjee (1987), e Unrau e Choi (1970), dedicaram-se à determinação da estrutura da galactomanana endospérmica,

à relação manose/galactose e às propriedades reológicas associadas a ela. Por outro lado, Braga e colaboradores (2011) exploraram o uso dessas galactomananas na criação de matrizes de afinidade para o isolamento de lectinas com afinidade à galactose.

Santos (2007) investigou a toxicidade da galactomanana extraída do endosperma da *C. pulcherrima* em camundongos provando sua inexistência e a utilizou para produção de filmes comestíveis no revestimento de frutos.

1.6 ALLIUM SATIVUM

Allium sativum (*A. sativum*), popularmente conhecido como alho é uma planta da família Liliaceae composta por um bulbo maior e cerca de 6 a 35 bulbos menores que ficam presos e protegidos por uma casca branca (Kuefe, 2017). Seu uso é datado de cerca de 1550 a.C., mencionado no “Papiro Ebers” e bem documentado pelos egípcios, gregos e romanos. Acredita-se que o nome ‘alho’ pode ter surgido a partir da palavra celta ‘*all*’ que significa pungente e ele parece ter sua origem na região central da Ásia, logo em seguida tendo se espalhado para China, região Mediterrânea antes de chegar ao oeste e região Central e Meridional da Europa, Norte da África e México (Londhe *et al.*, 2011; Sendl, 1995).

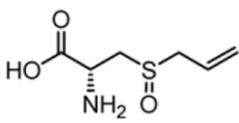
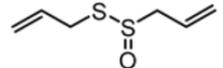
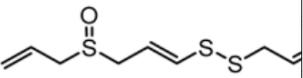
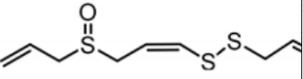
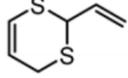
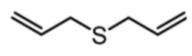
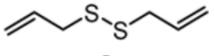
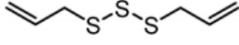
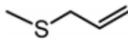
Seus efeitos medicinais são bem reconhecidos, os faraós egípcios, bem como os trabalhadores das pirâmides, faziam uso do alho. Na Grécia Antiga, figuras notáveis como Aristóteles, Hipócrates e Aristófanes, juntamente com outros estudiosos, recomendavam o alho devido aos seus efeitos farmacológicos. Na Roma Antiga, o naturalista Plínio, o Velho, e Discórides, médico chefe do exército romano, prescreveram alho para diversos fins terapêuticos (Sendl, 1995).

A sua composição química e os compostos bioativos são afetados por diversos fatores, como as condições pré-colheita, o genótipo, fertilização, disponibilidade de água, luz, temperatura e também condições pós-colheita relacionadas a armazenagem e processamento (Tavares, 2021).

O bulbo de alho contém aproximadamente 65% de água, 28% de carboidratos, 2% de proteínas, 1,2% de aminoácidos livres e 1,5% de fibras, 2,3% de compostos

organossulfurados, sendo esses os de maior interesse farmacológico que incluem ajoenes, tioisulfatos, vinilditiínas, sulfetos, trissulfeto de dialila e outros que representam 82% do teor total de enxofre do alho, demonstrados na figura 4. A aliina, principal sulfóxido de cisteína, presente compartmentalizada nas células do mesófilo, é convertida em alicina pela enzima hidrolítica alinase localizada inicialmente nas células da bainha do feixe vascular, que após o alho ser cortado ou esmagado, rompe-se a compartimentalização celular resultando na liberação da enzima e a hidrólise subsequente dos sulfóxidos em sulfetos voláteis (Oosthuizen *et al.*, 2018; Batiha *et al.*, 2020; Sendl, 1995).

Figura 6 - Lista e estrutura de alguns compostos contendo enxofre isolados de *A. sativum*

Compostos	Fórmula molecular	Estrutura
Aliin	$C_6H_{11}NO_3S$	
Alicina	$C_6H_{10}OS_2$	
E-Ajoene	$C_9H_{14}OS_3$	
Z-Ajoene	$C_9H_{14}OS_3$	
2-Vinil-4H-1,3-ditiina	$C_6H_8S_2$	
Sulfeto de dialila (DAS)	$C_6H_{10}S$	
Dissulfeto de dialila (DADS)	$C_6H_{10}S_2$	
Trissulfeto de dialila (DATS)	$C_6H_{10}S_3$	
Sulfeto de alilmetil (AMS)	C_4H_8S	

Fonte: Batiha *et al.*, 2020.

Em 1945, Cavallito e colaboradores publicaram a descoberta da alicina enquanto investigavam as propriedades antibacterianas do alho, esse composto é considerado um dos mais importantes bioativos produzidos pelo alho. Desde essa descoberta já é sabido que a alicina reage rapidamente com o grupo sulfidríla do aminoácido cisteína para formar dois moles de S-alilmercaptocisteína e água. Os impactos do alho e de seus compostos de enxofre são, em parte, atribuídos à capacidade

da alicina e de seus produtos transformados em inibir uma variedade significativa de enzimas que contém cisteína em seus sítios ativos (Sendl, 1995).

Responsável pelo odor característico do alho, a alicina é altamente instável, sensível à temperatura, ar ambiente, solventes orgânicos e pH, dessa forma se decompondo rapidamente produzindo outros compostos organossulfurados estáveis (Tavares *et al.*, 2021).

Uma revisão elaborada por Shang e colaboradores (2019) fez um levantamento dos compostos bioativos e as funções biológicas do alho e demonstrou que além dos muitos estudos sobre a atividade antimicrobiana ele também possui um amplo espectro de ação que inclui modulação do sistema imunológico através da regulação da expressão de várias interleucinas (IL-6, IL-10, TNF- α), proteção cardiovascular, atividade anti-hipertensiva e anti-hiperlipidêmica, anticâncer suprimindo o crescimento e proliferação celular, induzindo apoptose, entre outras atividades.

Além da ação dos extratos de alho e seus compostos de forma isolada, ele também apresenta efeito sinérgico com vários medicamentos, como nas drogas para tratamento de tuberculose, com vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente a cepas de *S. aureus*, com Imipenem e Meropenem frente a cepas de *E. coli* (Almeida *et al.*, 2013; Narimatsu *et al.*, 2019; Abbruzzese *et al.*, 1987).

Mais recentemente foram desenvolvidos estudos que incluíam extratos de alho em diversas formulações com aplicação tópica, como a formulação de creme vaginal para o tratamento de candidíase (Bahadoran *et al.*, 2010).

O efeito cicatrizante do alho está associado à sua ação anti-inflamatória, antimicrobiana e no favorecimento da reconstrução natural dos tecidos através da modulação do sistema imunológico como já mencionado anteriormente. Vários estudos avaliaram essa atividade, uma pesquisa demonstrou que o extrato hidroalcoólico de alho aumenta a proliferação de fibroblastos estimulando-os a produzir colágeno *in vitro*, do mesmo modo que em outro estudo acelerou o processo de cicatrização de queimaduras experimentais em coelhos; reduziu atividade inflamatória e promoveu a angiogênese no modelo de ferida excisional em ratos (Mohammad *et al.*, 2017; Sant Anna *et al.*, 2021; Farnood *et al.*, 2009).

Diante desses resultados que mostram o potencial terapêutico do *A. sativum* e a necessidades de novas opções farmacológicas tão ou mais eficazes que as já disponibilizadas atualmente, faz-se interessante o desenvolvimento e investigação de um novo bioproduto com efeito na cicatrização de feridas.

2 JUSTIFICATIVA

Feridas que não cicatrizam geram grande impacto socioeconômico, embora haja uma escassez de dados epidemiológicos aqui no Brasil, estudos realizados mostraram que a incidência de feridas é superior àquela observada em países desenvolvidos, uma revisão sistemática e metanálise que estimou a prevalência global de feridas crônicas, demonstrou que úlceras crônicas de diversas etiologias apresentaram uma prevalência de 2,21 por 1.000 habitantes (Vieira e Araujo, 2018; Martinego *et al.*, 2019). Muito disso causado pela falta de terapias para tratar feridas crônicas ou para acelerar o reparo de feridas agudas e redução da formação de cicatrizes. Um estudo feito em 2019 revelou que os custos relacionados ao tratamento de feridas são relacionados principalmente a amputações de pacientes diabéticos, onde o custo de hospitalização variou de US\$ 12.851 a US\$ 16.267, nos EUA entre 2014 e 2019 o número de pacientes do Medicare com feridas aumentou de 8,2 para 10,5 milhões e os custos de tratamento chegaram a US\$ 22,5 bilhões (Olsson *et al.*, 2019; Carter *et al.*, 2023). Dessa forma, é imperativo que haja novos estudos que busquem melhorar as abordagens terapêuticas que auxiliem a regeneração dos tecidos.

O tratamento de feridas continua sendo um desafio na prática clínica, pois são bastante frequentes e apresentam riscos de complicações tardias que aumentam a morbidade e mortalidade dos pacientes. Portanto, muitos esforços têm sido aplicados para o melhor entendimento do mecanismo fisiológico da cicatrização bem como das interferências que ocorrem durante este processo, além da descoberta de novos protótipos e medicamentos que possam aprimorar o tratamento de pacientes com lesões de pele.

O uso de produtos de origem vegetal para fins medicinais é uma prática que atravessa milênios. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima quem no ano 2000 cerca de 80% da população utilizava plantas medicinais com o objetivo de aliviar doenças já existentes. No processo de modulação da cicatrização de feridas não é diferente, há menções desde a pré-história quando plantas eram utilizadas como cataplasma (Piriz *et al.*, 2014).

Não é de hoje que os biopolímeros são alvos de estudos tanto para fins acadêmicos quanto para fins industriais e embora promissores seu uso farmacológico ainda é tímido. Dito isso e levando em consideração que os efeitos farmacológicos do

alho já são bem documentados na literatura através de estudos experimentais no que tange aos seus efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios e mais recentemente sobre o processo de cicatrização é importante o estudo e desenvolvimento e caracterização de um bioproduto com potenciais efeitos que auxiliem na modulação de fatores que ajudem no fechamento das feridas, seja de forma direta ou indireta.

Levando em consideração o que caracteriza um “curativo ideal” para feridas e a enorme diversidade de opções já existentes no mercado, o profissional da saúde e as instituições tem a desafiadora tarefa de decidir quanto a melhor escolha, tendo em vista que grande parte desses produtos disponíveis são de alto custo, tornando-se inviáveis para grande maioria da população principalmente para os usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Neste sentido, torna-se imperativo a busca de novos recursos, com menor custo, boa eficácia, tornando-se assim mais acessíveis à população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e realizar a caracterização físico-química de uma biomembrana composta de galactomanana e extrato bruto de *A. sativum*, visando investigar seu efeito na modulação do processo de cicatrização de feridas excisionais em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar extrato bruto de *Allium sativum*;
- Extrair galactomanana das sementes de *Caesalpinia pulcherrima*;
- Produzir biomembranas de galactomanana e extrato bruto de *Allium sativum*;
- Realizar caracterização físico-química das biomembranas produzidas;
- Investigar capacidade inchaço e compatibilidade sanguínea da BioMemGalactoAS;
- Avaliar atividade antioxidante do extrato e da BioMemGalactoAS;
- Investigar efeito das biomembranas na modulação da inflamação induzida pela ferida excisional através da determinação tecidual de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10);
- Avaliar o efeito das biomembranas sobre a liberação de fator de crescimento envolvidos na angiogênese (VEGF) na ferida excisional;
- Avaliar o efeito das biomembranas sobre o estresse oxidativo induzido pela ferida excisional, através da determinação tecidual de MDA, GSH.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS VEGETAIS

Sementes de *Caesalpinia pulcherrima* foram coletadas na cidade de Fortaleza – Ceará (junho e julho/2022). Após a coleta elas foram retiradas das vagens, limpas e devidamente selecionada, lavadas e depois secas em temperatura ambiente (25°C), guardadas em frascos para utilizações posteriores.

Os bulbos de alho (*Allium sativum*) foram adquiridos no comércio local da cidade de Fortaleza e levados ao laboratório. Os bulbilhos foram separados, selecionados, descascados, higienizados com água destilada e armazenados em geladeira (6°C) por até 3 dias.

4.2 EXTRAÇÃO DE GALACTOMANANA DAS SEMENTES DE *CAESALPINIA PULCHERRIMA*

A extração de galactomanana se deu conforme método descrito por Santos (2012), as sementes selecionadas foram submetidas à fervura em etanol 70% por um período de 20 minutos, objetivando inativar enzimas que poderiam clivar o polissacarídeo. Após fervura e resfriamento, o etanol foi retirado e adicionado água destilada na proporção de 1:5 (m:v, sementes/água). As sementes foram deixadas para entumescer *overnight* em temperatura ambiente. Após entumescimento elas foram separadas manualmente em endosperma, tegumento e cotilédones.

O endosperma obtido foi homogeneizado em liquidificador com água destilada até a obtenção de uma solução viscosa. A solução foi filtrada em rede de nylon (180 µm tamanho do poro) e logo em seguida precipitada em álcool etílico 100% na relação volume solução/álcool 1:2. O resíduo da solução que não foi filtrado foi levado ao liquidificador com água destilada até a formação de uma nova solução viscosa para uma nova extração.

Em seguida foi retirado o excesso de água do precipitado e imerso em Acetona P.A. por 30 min, após esse tempo a acetona é retirada e a galactomanana é seca em cabine de fluxo laminar.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *ALLIUM SATIVUM*

Os bulbilhos de alho descascados e higienizados foram pesados e em seguida espremidos com espremedor, com auxílio de uma rede de nylon de nylon (180 µm tamanho do poro). A massa de alho foi espremida até a completa remoção do extrato bruto que posteriormente será utilizado para preparação das biomembranas. O extrato é armazenado em frasco de vidro na geladeira (6°C) por até 3 dias.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *ALLIUM SATIVUM*

4.4.1 Quantificação de proteínas

Inicialmente como forma de triagem o extrato foi analisado através de dois métodos qualitativos para avaliar a presença de proteínas.

O primeiro teste foi o de Biureto, que trata-se de um teste geral para proteínas e peptídeos com mais de dois aminoácidos, baseado na quantificação de um complexo formado entre o cobre e as proteínas, onde o par de elétrons dos átomos de nitrogênio das amidas presentes nas ligações peptídicas servem de ligante para o átomo de cobre II (Zaia *et al.*, 1998).

Para realização do teste, em três tubos de ensaio separados e identificados foi adicionado 1 ml do extrato, 1ml de água que serviu como controle negativo e 1 ml de solução de albumina sérica bovina (BSA) 1% como controle positivo. A cada tubo foi adicionado 1 ml do reagente de biureteto, agitado e observado a mudança de coloração.

O segundo teste qualitativo realizado foi o Teste de Heller (Kyle e Shampo, 1988) que identifica a presença de proteínas através da desnaturação por ácido no meio. Portanto nesse teste, é adicionado ácido nítrico às amostras na proporção de 2:1 (v:v, amostra/ácido), de forma cuidadosa nas paredes do tubo de ensaio e observa-se a desnaturação das proteínas formando um anel branco em uma solução bifásica. Para esse teste foi usado água destilada como controle negativo e BSA 1% como controle positivo.

Após a identificação de proteína na amostra foi realizado um teste de quantificação de proteínas através do método de Bradford (Kruger, 2009).

Para a quantificação de proteínas no extrato construiu-se uma curva padrão com BSA, para isso foi preparada uma solução estoque na concentração de 1 mg/ml, em seguida essa solução foi diluída com água destilada em 10 tubos de ensaio para se obter 10 concentrações diferentes que foram de 1,0 – 0,1 mg/ml. Em novos tubos de ensaio foi pipetado 20 µL de cada solução e das amostras em triplicata do extrato e adicionado 1000 µL do reagente de Bradford, para o branco foi utilizado 20 µL de água destilada, os tubos de ensaio foram homogeneizados no vórtex e após 5 minutos lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm.

4.4.2 Quantificação de carboidratos

A determinação de carboidratos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico *sulfuric acid* – UV de Albalamesh e colaboradores (2013). Nesse procedimento, 1 ml da amostra do extrato de *Allium sativum*, diluída com água destilada a uma concentração de 0,1%, foi combinada com 3 ml de ácido sulfúrico concentrado em um tubo de ensaio e agitada em vórtex por 20 segundos. A temperatura da solução elevou-se rapidamente nos primeiros segundos após a adição do ácido, de modo que ela foi deixada para resfriar em banho de gelo. Após o resfriamento as soluções foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 315 nm. Para calcular a concentração de carboidratos em microgramas por microlitro, foi construída uma curva padrão com dextrose em concentrações de 10 – 100 µg/ml e utilizando água como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores demonstrados em média e desvio padrão.

4.4.3 Determinação de massa seca e umidade

A umidade de uma amostra corresponde à perda de peso sofrida quando aquecida em condições nas quais a água é removida, na prática não somente a água é removida, pois outras substâncias também se volatilizam nessas condições. O resíduo obtido no aquecimento é chamado de resíduo seco ou massa seca (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

O aquecimento direto da amostra a 105°C é o processo mais usual, portanto, nesse procedimento a estufa foi previamente aquecida à esta temperatura, cinco cápsulas de porcelana foram higienizadas e identificadas e levadas à estufa por 30 minutos para retirar qualquer umidade que possa ter ficado. Após esse tempo elas foram resfriadas em dessecador com sílica em gel por 15 min e logo em seguidas pesadas. A cada cápsula foi adicionado 3g do extrato de *Allium sativum*, os pesos foram anotados em exatidão e as amostras foram levadas a estufa por 3 horas. Depois desse tempo foram retiradas com auxílio de pinça e resfriadas em dessecador por 15 minutos e pesadas. As análises foram realizadas em quintuplicata e os valores demonstrados em média e desvio padrão.

O cálculo para determinação da umidade foi realizado pela fórmula:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{M_0 - M_f}{M_0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

M₀: massa inicial

M_f: massa após secagem

4.4.4 Quantificação de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos do extrato de *Allium sativum* foi determinado utilizando método de Folin-Ciocalteu padronizado por Singleton e Rossi (1965) com algumas modificações. Inicialmente uma curva de calibração foi construída com ácido gálico em concentrações de 20 – 200 mg/L. Para o ensaio 0,25 ml das soluções

de ácido gálico diluídas em água destilada e do extrato foram pipetadas em tubos de ensaio, em seguida foi adicionado 2,75 ml do reagente de Folin-Ciocalteu a 3%, agitado em vórtex por 10s e repousado por 5 minutos. Após esse tempo foi acrescentado 0,25 ml de solução de carbonato de sódio a 10%, agitado por 10s em vórtex e deixado descansar por 60 minutos na ausência de luz. Depois desse tempo todas as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. Para o branco foi utilizado água destilada. Os testes foram realizados em triplicata e a concentração foi determinada utilizando a equação da reta do gráfico construído com o padrão de ácido gálico.

4.4.5 Identificação de metabólitos secundários

Para identificação de classes de metabólitos secundários no extrato de *Allium sativum* foram utilizadas metodologias adaptadas de Silva e Lima (2016), Radi e Terrones (2007) e Fonseca e colaboradores (2019). Esses testes são baseados em precipitação e coloração do extrato na identificação de cumarinas, taninos, saponinas terpenoides e esteroides. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para o teste de identificação cumarinas em um tubo de ensaio adicionou-se 2 ml do extrato de *Allium sativum*, 2 ml de solução de NaOH 10% e cobre com papel filtro. Essa mistura foi ao banho maria a 100°C por 10 minutos. Após esse tempo, observa-se a solução sob a luz ultravioleta. A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

Na identificação de taninos, em um tubo de ensaio a 2 ml de extrato de *Allium sativum* adicionou-se 10 ml de água destilada, utilizando uma pipeta de pasteur, duas gotas de uma solução de cloreto de férrico 10% foi incorporada. Coloração azul indica presença de taninos hidrolisáveis, coloração verde de taninos condensados.

No teste de identificação saponinas 5 ml de água destilada foi adicionada em 2 ml do extrato de *Allium sativum* e levado ao banho maria a 37°C por 10 minutos. Após resfriamento a solução foi agitada vigorosamente e deixou em repouso por 20 min. A presença de saponinas é classificada pela formação de espuma persistente.

Para identificação terpenóides, foi empregado 2 ml do extrato de *Allium sativum* e adicionado 2 ml de clorofórmio e 4 a 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado, a formação de uma cor marrom vermelho ou o surgimento de colorações que vão do azul ao verde indicam presença desse metabólito.

Na identificação de esteroides, a 2 ml da solução estoque de extrato de *Allium sativum* e adicionou-se 2 ml de clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, formação de cor marrom vermelho mutável ou o surgimento de colorações que vão do azul ao verde indicativo a presença desse metabólito.

4.4.6 Análise Metabolômica do extrato de *Allium sativum* através de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A análise do perfil metabólico do extrato foi realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal (LABFIVE/UFC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, campus Pici, em parceria com o Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.

A extração dos metabólitos foi realizada a partir do extrato bruto de *A. sativum*, segundo metodologia descrita por Lisec *et al.* (2006), com modificações. O extrato foi homogeneizado em metanol gelado e incubado a 70 °C, por 15 min, com agitação constante. Nessa ocasião, o ribitol a 0,2 mg mL⁻¹ (em água ultrapura) foi adicionado como padrão interno. Após o período de incubação, o homogenato foi centrifugado a 14.000 × g por 10 min e ao sobrenadante coletado foi adicionado uma solução de clorofórmio/água (1:2 v/v), sendo a mistura resultante agitada em vórtex por 15 s. Para separação das fases, esta mistura foi centrifugada a 3.000 × g por 15 min, e alíquotas de 150 µL da fase superior (fase polar) foram coletadas e secas em SpeedVac overnight.

O processo de derivatização do extrato seco foi iniciado através da sua reação com metoxiamina (20 mg mL⁻¹ em piridina) a 37 °C, por 2 h, e subsequentemente com N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) a 37 °C, por 30 min. A separação e detecção dos metabólitos foi realizada segundo Roessner *et al.* (2001) com modificações, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas,

sendo utilizado o cromatógrafo gasoso GC/MS-QP-PLUS2010 da Shimadzu, Japão. Nesta etapa, 1,0 µL da amostra derivatizada foi injetada no modo split (1:10), usando hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. A coluna capilar RTX-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) foi utilizada para separação dos metabólitos, sendo configurada a temperatura inicial a 80 °C por 2 min, seguida de aumento a uma taxa de 10 °C min⁻¹ até alcançar a temperatura final de 310 °C, que foi mantida por 8 min. As temperaturas de injeção, da interface e da fonte de íons foram de 230, 250 e 200 °C, respectivamente. O espectrômetro de massas operou a 70 eV (EI), com intervalo de detecção de fragmentos de massa de 40-700 (m/z), iniciando após o tempo de 3 min. Os cromatogramas e os espectros de massas foram analisados usando o programa Xcalibur™ 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Os metabólitos foram identificados com base no tempo de retenção e espectro de fragmentação, comparando com a biblioteca interna, construída a partir de uma mistura de padrões, e com seus espectros de massas previamente identificados no banco de dados Golm Metabolome (GMD). A concentração relativa de cada metabólito foi determinada e normalizada pela área do pico correspondente ao ribitol, com posterior correção pela massa da amostra utilizada durante a extração.

4.5 ELABORAÇÃO DA BIOMEMBRANA DE GALACTOMANANA DE *C. PULCHERRIMA* E *ALLIUM SATIVUM* (BIOMEMGALACTOAS)

As soluções filmogênicas foram preparadas dissolvendo o carboidrato seco em água destilada na proporção de 1:100 (m/v, galatomanana/água destilada). As biomembranas foram preparadas em três formulações diferentes utilizando a solução filmogênica, em duas delas foi utilizado o extrato bruto de alho e glicerina e em uma delas não foi adicionado extrato, conforme demonstrado na Tabela 1.

Um estudo desenvolvido por Prati *et al* (2014) quantificou alicina, principal bioativo do alho (Borlinghaus *et al.*, 2014), em cinco variedades de alho e obteve uma concentração de 24,31±0,27 mg.g⁻¹ para o alho roxinho, variedade utilizada neste estudo, diante disso, objetivando elaborar biomembranas com uma concentração de 0,5 e

0,8% (p/p) de alicina em relação ao peso da solução filmogênica de 0%, o peso do extrato foi calculado e chegamos aos valores descritos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Composição das biomembranas

Concentração	Solução galactomanana (g)	Extrato bruto de alho (g)	Glicerina bidestilada (g)
0%	34 g	0g	0,34g
17%	34g	7,1g	0,34g
26%	34g	11,83g	0,34g

Fonte: Autor, 2024.

Cada solução foi homogeneizada por 30 minutos em agitador magnético a uma velocidade de 70 RPM, após esse tempo elas foram submetidas ao vácuo por 2 horas para remoção de bolhas incorporadas durante a agitação.

Em seguida, a solução foi distribuída em placas de petri de 9 cm de diâmetro e levada à estufa a 50°C por um período de 12 horas e em seguida desenformadas, embaladas e esterilizadas em luz UV por 20 minutos e armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMEMGALACTOAS

A biomembrana foi caracterizada quanto as suas propriedades físico-químicas utilizando metodologia adaptada de Chen e colaboradores (2021). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.1 Determinação da concentração de galactomanana por massa seca

A determinação da concentração de galactomanana nas soluções filmogênicas foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente no tópico 4.4.3. Os valores foram demonstrados em média e desvio padrão.

4.6.2 Estudos de absorção de umidade

Para esse teste inicialmente foram preparadas duas soluções, um tampão fosfato de sódio (PBS) (reagentes e quantidades descritos no anexo II) e uma solução simuladora de fluido corpóreo (SBF) (reagentes e quantidades descritos no anexo II), o procedimento foi seguido conforme método descrito por Lemos (2008).

Ambas as soluções utilizaram água MilliQ como solvente. As quantidades descritas perfazem um volume de 1 litro. Ao final do preparo o pH das soluções foi ajustado para 7,4.

Após preparo das soluções, a fim de simular o ambiente da ferida foram preparados géis de agarose na concentração de 1% utilizando PBS e SBF como solventes, 5 ml da solução de agarose foi colocado em placas de 6 poços e deixado para resfriar e endurecer a temperatura ambiente. Utilizando um Punch cirúrgico n° 6 foi feita uma depressão no gel. No bloco de gel preparado com PBS foi adicionado 500 µL de PBS no poço criado com o punch, da mesma forma com o gel preparado com SBF.

Para realização dos testes, a biomembrana, nas três diferentes concentrações, foram cortadas no tamanho de 0,5x0,5 cm, pesadas e posicionada em suportes feitos com cassetes histológicos, previamente pesados e posicionadas em cima do poço feito nos géis. Em tempos pré-determinados, a biomembrana era retirada, pesada e retornada ao gel.

A taxa de inchaço das biomembranas foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de inchaço (\%)} = \frac{p_1 - p_0}{p_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

P1: peso da biomembrana inchada

P0: peso da biomembrana seca

4.6.3 Estudo de permeabilidade ao vapor de água

Objetivando avaliar a capacidade de troca gasosa das biomembranas 10 ml de água destilada foram transferidas para béquers com capacidade para 10 ml e sua abertura foi tampada com a biomembrana e vedada com parafilm e foram mantidos a 37°C por 12 horas. A água evaporada através das biomembranas foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Permeabilidade ao vapor de água (\%)} = \frac{W}{AT} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

W: a quantidade de água evaporada

A: área da superfície

T: tempo de incubação

4.6.4 Ensaio de atividade hemolítica

Para esse ensaio 8 ml de sangue foi retirado de um camundongo saudável e misturado com 1 ml de anticoagulante citrato de sódio a 3,8%, em seguida diluído com 2,5 ml de solução salina 0,9%. As biomembranas foram incubadas em 200 µL do sangue resultante a 37°C por 60 minutos. Em seguida, as biomembranas são removidas e o sangue restante centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante é resgatado e lido em espectrofotômetro a 545 nm. As amostras de sangue

misturadas com salina normal e água destilada serviram como controle positivo e negativo, respectivamente (Chen *et al.*, 2021). A porcentagem de hemólise foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\text{porcentagem de hemólise (\%)} = Dt - Dnc \times \frac{Dt - Dnc}{Dpc - Dnc} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

Dt: valor da absorbância do grupo estudado

Dnc: valor da absorbância do controle negativo

Dpc: valor da absorbância do controle positivo

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

4.7.1 DPPH e ABTS

A avaliação da atividade antioxidante foi conduzida por meio dos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)), seguindo as técnicas propostas por Becker *et al.* (2019) e Re *et al.* (1999), respectivamente, com modificações específicas. Ambos os ensaios foram executados em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, utilizando um leitor Elisa BioTek modelo ELX 800.

As diluições das amostras de extrato de *Allium sativum* e das soluções filmogênicas (0, 17 e 26%) e dos padrões positivos (ácido gálico e quercetina) para as avaliações quantitativas na microplaca foram derivadas de uma solução mãe com concentração de 2,0 mg/mL, sendo estas: 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL. A leitura de absorbância foi realizada a 515 nm para o radical DPPH, após 60 minutos de incubação, e a 630 nm para o radical ABTS⁺, após 10 minutos de incubação. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição, calculada pela fórmula abaixo:

$$PI\% = \left[\frac{AC-AS}{AC} \right] \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

AC: é a absorbância da solução de controle DPPH ou ABTS no tempo inicial

AS: é a absorbância da solução de amostra contendo DPPH ou ABTS no tempo final.

Como padrão negativo, todas as soluções foram utilizadas, excluindo-se a amostra. Valores relacionados às colorações naturais dos extratos foram excluídos da análise. O extrato bruto e as soluções filmogênicas (2,0 mg) de cada amostra foi solubilizado em 1,0 mL de metanol, resultando em uma concentração final de 2,0 mg/mL. Os antioxidantes quercetina e ácido gálico foram empregados para fins de comparação.

4.8 MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDA EXCISIONAL

4.8.1 Animais

Para os protocolos *in vivo* foram utilizados 180 camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem swiss (8 – 10 semanas de idade, 20 – 30 g) mantidos no Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC (NPDM). Os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas claro/escuro em temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controlados, com água e ração *ad libitum*.

4.8.2 Aspectos éticos

Todos os protocolos realizados neste estudo estão em consenso com as diretrizes éticas estabelecidas pelos Princípios Éticos na Experimentação em Animais adotados pelo Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi analisado e

aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do NPDM (CEUA – NPDM) sob o nº 36200922-0 (ANEXO I).

4.8.3 Indução de ferida excisional

Todos os animais permaneceram na sala de experimentação do biotério por no mínimo 7 dias e passaram pelo processo de aclimatação para redução de estresse previamente ao início dos protocolos.

No dia da cirurgia as bancadas foram previamente higienizadas com álcool etílico a 70% de modo a prevenir contaminação. Após isso os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg via i.p.) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, via i.p.). Após anestesia, o dorso dos animais foi higienizado com clorexidina degermante 2%, tricotomizado (8cm²) e desinfetada com iodopovidona 1%.

A ferida excisional foi induzida com auxílio de punch cirúrgico nº 6 (6mm) para biópsia de pele (Cardoso *et al.*, 2007), com ajuda de pinça e tesoura, foi retirada completamente a epiderme e parte da derme, expondo-se a fáscia muscular. Em cada animal foram realizadas duas feridas com distância mínima de aproximadamente 0,5 cm entre elas. O implante da biomembrana foi introduzido sobre a fáscia muscular de modo a ficar acomodada sob as bordas da pele íntegra. Após a implantação da membrana, com exceção dos animais do grupo Sham, as feridas não foram suturadas para que a cicatrização ocorresse por segunda intenção. Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam 1 ml de solução salina estéril, por via subcutânea, para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido e monitorados até a completa recuperação da anestesia.

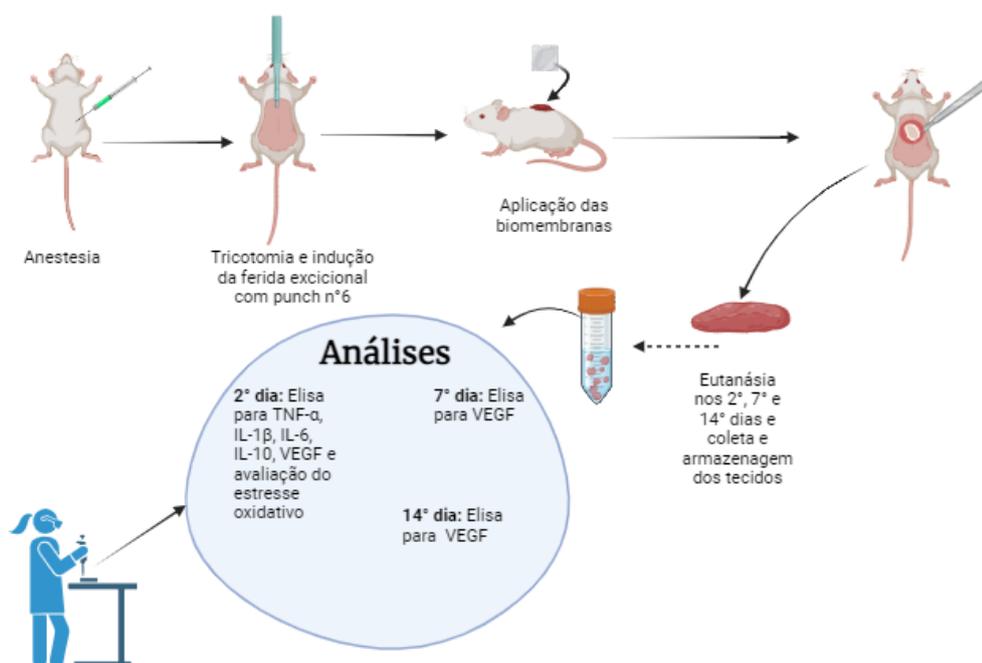
4.8.4 Definição dos grupos experimentais

Após a indução da ferida os animais foram distribuídos aleatoriamente nas caixas individuais, de modo a se obter um N de 15 animais por grupo. A biomembrana foi aplicada somente no dia da indução da ferida.

Abaixo segue a distribuição dos grupos experimentais:

- SHAM: ferida excisional + solução salina 0,9% somente no dia do procedimento cirúrgico;
- VEIC: ferida excisional + biomembrana 0% (sem adição de extrato de *A. sativum*) aplicada somente no dia do procedimento cirúrgico;
- BioMemGalactoAs17%: ferida excisional + biomembrana 17% (biomembrana contendo 20,88% de extrato bruto de *A. sativum* (p/p) aplicada somente no dia do procedimento cirúrgico;
- BioMemGalactoAs26%: ferida excisional + biomembrana 26% (biomembrana contendo 34,79% de extrato bruto de *A. sativum* (p/p), aplicada somente no dia do procedimento cirúrgico.

Figura 7 - Representação dos protocolos experimentais utilizados no estudo



Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e em seguida tricotomizados. A ferida foi induzida com um punch cirúrgico nº6 e as biomembranas aplicadas nos grupos tratados. A eutanásia aconteceu nos dias 2, 7 e 14 pós cirúrgico e em cada período foram feitas as avaliações explicitadas na figura.

Fonte: Autor, 2024.

4.8.5 Obtenção das amostras teciduais

A eutanásia dos animais foi realizada através de sobredose de anestésico, com cloridrato de xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (300 mg/kg, i.p.). A pele dos animais foi removida com auxílio de pinça e tesoura de forma a abranger toda a lesão e parte da pele saudável nas bordas até que a camada muscular fosse exposta. Os dias 2, 7 e 14 foram escolhidos para avaliação de estresse oxidativo e dos mediadores envolvidos na inflamação e cicatrização. Os tecidos coletados foram armazenados em freezer a -80°C até o momento da análise.

4.8.6 Quantificação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF

As amostras de tecido coletadas no 2º dia de pós-cirúrgico foram destinadas às dosagens de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF. No 7º e 14º dias as amostras foram utilizadas para quantificação VEGF (FUJIMI et al., 2009; INFANGER et al., 2004; JANG et al., 2013; YANG et al., 2001).

Para realização do protocolo, os tecidos coletados foram homogeneizados em solução PBS na proporção de 10% (p:v, tecido/PBS) com auxílio de homogeneizador e em seguida centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos para remoção de tecidos que não foram homogeneizados completamente e obtenção do sobrenadante. A concentração das amostras foi obtida a partir da construção de uma curva padrão de cada citocina em 8 concentrações diferentes, iniciando em 1000 pg/ml para IL-1 β e VEGF e 2000 pg/ml para IL-10, TGF- β , IL-6 TNF- α (R&D Systems).

4.8.7 Avaliação do estresse oxidativo

4.8.7.1 Quantificação dos níveis de MDA (*malondialdeído*)

As amostras de tecido coletadas no dia 2 foram destinadas à quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA). O MDA é um dos principais produtos da decomposição de ácidos graxos poliinsaturados formados durante o processo oxidativo. Sua reação envolve o ácido 2-tiobarbiturico com o malonaldeído produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente no comprimento de onda de 532 nm (Draper e Hadley, 1990).

O tecido coletado foi homogeneizado a 10% (p:v, tecido/tampão) em tampão fosfato 0,05M (pH 7,4). Após isso, 250 μ L do homogenato é transferido para um tubo eppendorf e levado ao banho maria a 37°C por 1 hora. Passado o tempo, afim de interromper a peroxidação, 400 μ L de ácido perclórico 35% é adicionado às amostras que são então centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos para se obter o 600 μ L de sobrenadante. Em um novo tubo eppendorf, ao sobrenadante obtido foi adicionado 200 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi levada a um novo banho maria a 100°C por 30 minutos. Após o resfriamento as amostras foram plaqueadas em triplicata e a leitura da absorbância realizada em leitora de microplacas no comprimento de onda de 532nm.

Uma curva padrão com 8 concentrações conhecidas de tetrametoxipropano foi construída e a concentração as amostras foi calculada através da equação da reta fornecida pela curva. Os resultados foram expressos em MDS/g de tecido.

4.8.7.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

As amostras do 2° dia foram utilizadas para determinação quantitativa de GSH que foi conduzida utilizando uma versão modificada do método de Sedlak e Lindsay (1968). Esse procedimento fundamenta-se na indução de coloração amarela pela adição

do 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), conhecido como reagente de Ellman (DTNB), a compostos de sulfidril. A reação entre DTNB e GSH resulta na formação de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e GSSG. Para essa análise, empregou-se uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de GSH para a calibração do método.

As amostras de tecido foram homogeneizadas a 10% (p:v, tecido/tampão) em solução de EDTA 0,02 M. Subsequentemente, 60 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% foram adicionados a 40 μ L de cada amostra para precipitar as proteínas presentes no material biológico. O material resultante foi centrifugado (5000 rpm, 15 min, 4°C), e 60 μ L do sobrenadante foram então pipetados em uma placa de Elisa. Na etapa de leitura, 102 μ L da solução de leitura DTNB 0,01 M (ácido 5,5-ditobis(2-nitrobenzóico) e Tris-EDTA) foram adicionados, e a absorbância foi imediatamente medida a 412 nm em uma leitora de microplacas. Todo o experimento transcorreu sob refrigeração controlada (10-15 °C).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software *Graphpad Prism* (versão 8.8.1). Para avaliação da distribuição normal foi utilizado o teste de Shapiro-Wilke. Os dados paramétricos que seguiram a normalidade foram avaliados pelo teste t, quando comparados dois grupos, ou ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey quando comparados três ou mais grupos. Os dados que não entraram na normalidade, não-paramétricos, foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney, quando comparados dois grupos, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, para comparação entre três ou mais grupos. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DV) ou mediana seguido dos seus valores mínimo e máximo. Para todas as análises foi adotado significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

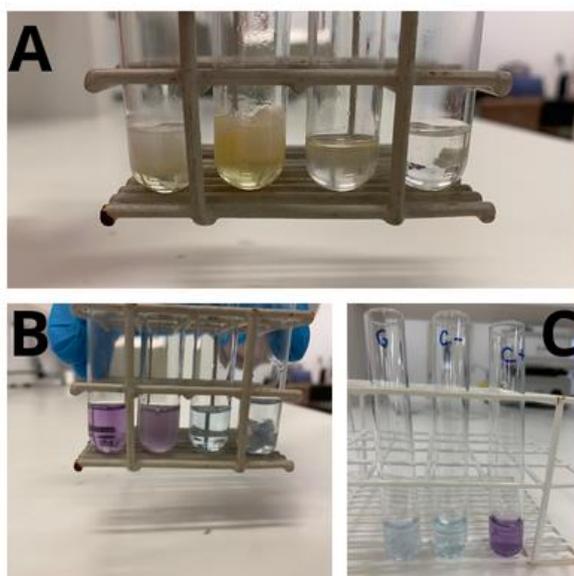
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *ALLIUM SATIVUM*

5.1.1 Proteínas

Inicialmente, como forma de triagem para verificar presença ou ausência de proteínas no extrato e na solução filmogênica de galactomanana foram realizados dois testes qualitativos para identificar a presença de proteínas. O teste de biureto que identifica a presença de proteínas através da mudança de coloração das soluções para tons de violeta ao adicionar o reagente de biureto; e o teste de Heller que desnatura proteínas através do ácido nítrico formando um anel branco em uma solução bifásica.

Ao submeter o extrato bruto de *A. sativum* e a solução de galactomanana aos testes qualitativos obtivemos resultado positivo para o extrato e negativo para a solução filmogênica em ambos os testes, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Resultado dos testes de Biureto e Heller no extrato bruto de *A. sativum* e solução de galactomanana



Resultados dos testes qualitativos para detecção de carboidrato. **A:** Teste de Heller, da esquerda para direita: solução de BSA, extrato bruto de *A. sativum*, solução de galactomanana e água como controle negativo. **B:** Teste de Biureto, da esquerda para direita: solução de BSA, extrato bruto de *A. sativum*, água como controle negativo e solução de galactomanana. **C:** Teste de Biureto, da esquerda para direita: solução de galactomanana, água destilada e solução de BSA.

Após triagem com os métodos qualitativos foi empregado um teste quantitativo, método de Bradford (1979), que é uma técnica rápida e precisa para estimar a concentração de proteínas e tornou-se a preferida em muitos laboratórios por ser mais simples, sensível e sujeita a menos interferências de reagentes comuns e componentes não proteicos de amostras biológicas que outros métodos, como o de Lowry (Kruger, 200).

Para construção de uma curva padrão, é recomendado incluir pelo menos quatro pontos, além da concentração zero, sendo três réplicas para cada ponto (Pires *et al.*, 2017). Para criação da curva de calibração foram utilizados oito pontos com três replicatas para cada ponto. Por apresentar um R^2 de 0,9923 é possível concluir que há um ajuste mais preciso do modelo aos dados.

O teor de proteínas encontrado no extrato de bruto de *A. sativum* foi de $0,570 \pm 0,020$ mg/mL.

5.1.2 Carboidratos

Para quantificação do teor de carboidratos no extrato bruto de alho foi utilizado o método descrito por Albalamesh *et al.* (2013), que o desenvolveu com o objetivo de introduzir um novo método alternativo ao método colorimétrico de DuBois *et al.*, amplamente utilizado, propondo uma nova metodologia mais rápida, precisa e sem os perigos do uso do fenol. Esse método se baseia no potencial de absorção UV dos subprodutos da hidrólise de carboidratos com adição de ácido sulfúrico concentrado podendo ser utilizado para monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos de alto peso molecular.

Para construção da curva de calibração do teste, foi utilizado dextrose P.A. em 9 concentrações que vão de 0,01 a 0,1 mg/mL em nove pontos em três repetições cada

ponto, assim como mostrado no gráfico 2. A equação da reta foi calculada e foi obtido um R^2 de 0,9913 representando ajuste fiel aos dados.

O teor de carboidratos identificados no extrato bruto de *A. sativum* foi de $192,642 \pm 4,541$ mg/mL.

5.1.3 Massa seca e umidade

Todos os alimentos contêm água, em maior ou menor proporção. A determinação da massa seca e umidade em extratos vegetais é um procedimento essencial para entender a quantidade de água presente e, conseqüentemente, a sua concentração.

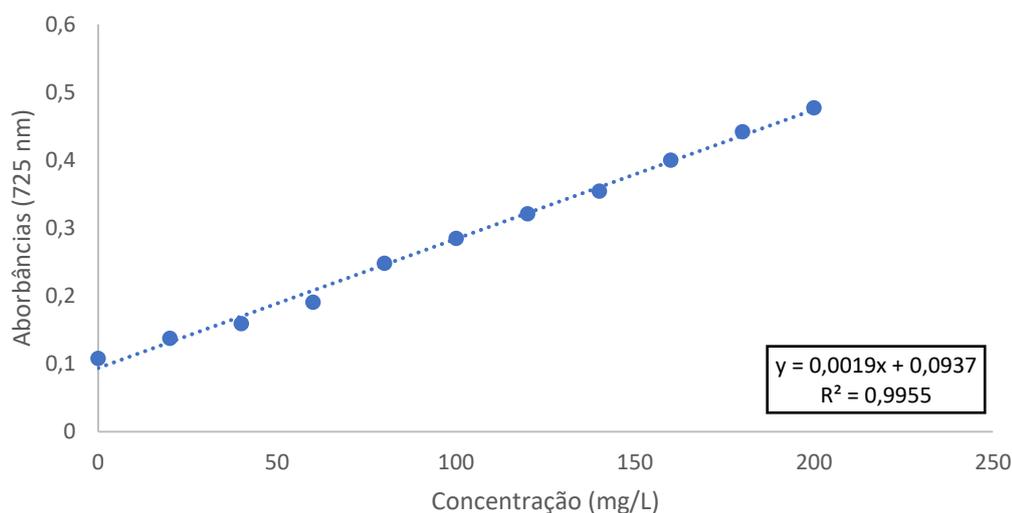
O extrato bruto de alho, cuja concentração média foi determinada em $3,370 \pm 0,670$ g/ml de extrato bruto com base em 21 experimentos de obtenção do extrato (tópico 4.3), foi submetido à análise de massa seca e umidade em 5 repetições. Os resultados revelaram uma média de $67,68 \pm 0,2\%$ de umidade e $32,32 \pm 0,2\%$ de massa seca. A correlação entre a concentração do extrato e os valores de umidade e massa seca sugere uma relação complexa entre a quantidade de sólidos dissolvidos, a água presente e a concentração global do extrato. A elevada porcentagem de umidade está associada a uma maior presença de água, enquanto a porcentagem de massa seca reflete a concentração de compostos sólidos no extrato.

5.1.4 Compostos fenólicos

O ensaio colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu padronizado por Singleton e Rossi (1965) é um dos métodos espectrofotométricos mais aceitos e utilizados com o objetivo de avaliar a atividade indireta do potencial antioxidante de uma amostra, levando em consideração que ele utiliza como princípio a mensuração do poder redutor em extratos vegetais (Pires *et al.*, 2017).

Para curva padrão de ácido gálico foram utilizados dez pontos em triplicata, como representado no gráfico 3. A partir desse gráfico foi calculada a equação da reta com um coeficiente de determinação de 0,9955 implicando ajuste fiel da curva de calibração aos dados.

Figura 9 - Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 200 mg/L versus as absorvâncias lidas a 725 nm



Fonte: Autor, 2024.

O teor de compostos fenólicos identificados no extrato bruto de *A. sativum* foi de $43,32 \pm 3,97$ mg GAE/g.

5.1.5 Metabólitos secundários

Os produtos químicos produzidos pelas plantas podem ser classificados como metabólitos primários e secundários. Os primários são todos aqueles envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos, nucleotídeos, bem como moléculas maiores sintetizadas a partir deles. Os metabólitos secundários, também conhecidos como especializados, são altamente específicos, e estão relacionados a proteção dos vegetais, estresses bióticos e abióticos além de terem grande apelo comercial pelas indústrias biofarmacêutica, de corantes e aromas (Borges e Amorim, 2020).

Na Tabela 2 estão representados os resultados da identificação dos metabólitos secundários no extrato bruto de alho. Nos testes observou-se respostas positivas para taninos condensados, terpenóides e esteróides.

Tabela 2 - Identificação dos metabólitos secundários do extrato bruto de *A. sativum*.

Metabólitos secundários	Reações	Extrato bruto de <i>A. sativum</i>
Cumarinas	Hidróxido de sódio 10%	-
Taninos	Cloreto férrico 10%	+ (condensados)
Saponinas	Formação de espuma	-
Terpenóides	Clorofórmio + ác. Sulfúrico	+
Esteróides	Clorofórmio + ác. Sulfúrico	+

+ (positivo), - (negativo)

Fonte: Autor, 2024

5.1.6 Análise metabolômica do extrato bruto de *A. sativum*

Na análise metabolômica do extrato bruto de *A. sativum* foi possível identificar 55 metabólitos, dos quais 17 são ácidos orgânicos, 15 são aminoácidos, 21 são carboidratos e 2 poliaminas, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Compostos identificados na análise metabolômica do extrato bruto de *A. sativum*

Metabólitos	Tipo de composto	Tempo de retenção (min)
Ácido Pirúvico	Ácido orgânico	7.08
Espermidina	Poliamina	10.95
Serina	Aminoácido	11.79

Ácido fosfórico	Ácido orgânico	12.13
Gliceraldeído-3-fosfato	Ácido orgânico	12.18
Prolina	Aminoácido	12.56
Glicina	Aminoácido	12.75
Ácido glicérico	Ácido orgânico	13.28
Ácido fumárico	Ácido orgânico	13.43
Uracila	Carboidrato	13.86
Treonina	Aminoácido	14.28
Cisteína	Aminoácido	14.82
Beta - alanina	Aminoácido	14.88
Ácido itacônico	Ácido orgânico	15.26
Ácido 4-Hidroxi-butírico	Ácido orgânico	15.71
Ácido 4-Aminobutírico	Ácido orgânico	15.91
Ácido málico	Ácido orgânico	15.97
Arabinose	Carboidrato	16.35
Metionina	Aminoácido	16.42
Ácido piroglutâmico	Ácido orgânico	16.48
Asparagina	Aminoácido	17.12
Ácido alfa-cetoglutárico	Ácido orgânico	17.3
Acetilserina	Aminoácido	17.38
Putrescina	Poliamina	17.67
Triptofano	Aminoácido	18.21
Dímero do ácido ascórbico	Ácido orgânico	18.52
Ácido glutárico	Ácido orgânico	18.71
Lixose	Carboidrato	18.94
Hidroxi-prolina	Aminoácido	19.37
2-Desoxiglicose	Carboidrato	19.59
Ácido cis-aconítico	Ácido orgânico	19.73
Isoleucina	Aminoácido	19.79
Eritritol	Carboidrato	19.99
Glutamina	Aminoácido	20.10
Asparagina	Aminoácido	20.25
Levoglucozan	Carboidrato	20.68

Ácido eritronico	Ácido orgânico	20.82
Lactulose	Carboidrato	20.88
Ornitina	Aminoácido	21.11
Ácido p-cumárico	Ácido orgânico	21.55
Ribose	Carboidrato	21.58
Maltose	Carboidrato	21.81
Xilitol	Carboidrato	21.92
Arabitol	Carboidrato	22.12
Manitol	Carboidrato	22.45
Trealose	Carboidrato	22.89
Xilose	Carboidrato	23.50
Ácido 5-aminovalérico	Ácido orgânico	23.71
Tagatose	Carboidrato	24.23
Eritrose	Carboidrato	26.02
Maltotriose	Carboidrato	28.57
Sorbitol	Carboidrato	29.11
3-Desoxiglucosona	Carboidrato	29.36
Kestose	Carboidrato	30.01
Glucoheptose	Carboidrato	30.91

Cromatograma em Anexo III

Fonte: Autor, 2024.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMEMBRANA

5.2.1 Determinação da concentração de galactomanana por massa seca

Durante o procedimento de extração da galactomanana das sementes da *C. pulcherrima* elas são fervidas afim de inativar enzimas que poderiam vir a clivar o polissacarídeo, os testes qualitativos na identificação de proteínas demonstraram não haver presença delas na solução feita a partir do carboidrato isolado, de modo que para

calcular a porcentagem de carboidrato na solução de galactomanana utilizamos o método de determinação massa seca para a solução filmogênica produzida somente com o carboidrato seco dissolvido em água destilada.

Objetivando produzir uma solução de aproximadamente 1% de galactomanana 3,0070 g do carboidrato seco foi pesado, dissolvido em 300,284g de água destilada e homogeneizada em agitador magnético a 250 rpm *overnight*. Para quantificar o polissacarídeo na amostra o teste foi feito em cinco repetições descritas na tabela X.

A média da concentração de galactomanana na solução filmogênica foi de $0,97\pm 0,02\%$.

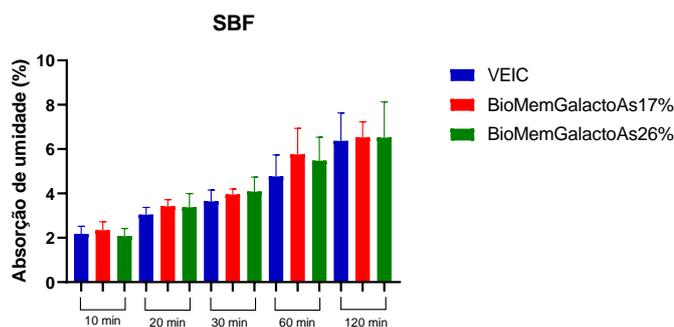
5.2.2 Estudos de absorção de umidade

A capacidade da biomembrana de absorver as soluções, PBS e SBF, foi avaliada. Os resultados mostraram que a porcentagem de absorção da biomembrana sem adição de extrato atingiu o nível mais alto de $6,37\pm 1,36\%$ após 120 minutos em contato com a ferida simulada em gel de agarose com SBF e $8,42\pm 2,95\%$ em PBS. Já a Biomembrana carregada com 17% de extrato bruto de *A. sativum* inchou $8,03\pm 3,42\%$ em SBF e $6,50\pm 1,20\%$ em PBS. A biomembrana carregada com 26% de extrato em 120 minutos apresentou porcentagem de inchaço de $6,52\pm 1,61\%$ em SBF e $7,59\pm 1,07\%$ em PBS.

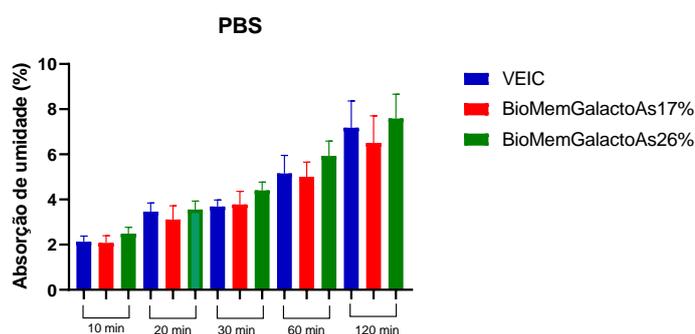
Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar a capacidade de inchaço das biomembranas nas soluções (SBF e PBS), da mesma forma que não há diferença de inchaço entre as biomembranas carregadas com diferentes concentrações de extrato (17 e 26%).

Figura 10 -Capacidade de absorção de umidade da BioMemGalactoAs

A



B

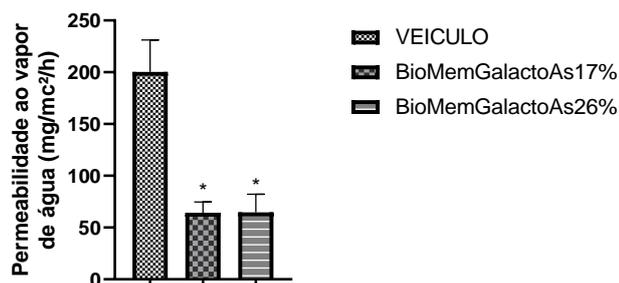


As barras representam média±desvio padrão da capacidade de absorção de umidade (%) da biomembrana sem extrato (veículo), biomembrana com 17% e 26% de extrato em solução SBF (A) e PBS (B). ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparação entre as médias.

5.2.3 Permeabilidade ao vapor de água

Na Figura 11 estão demonstrados os valores da permeabilidade ao vapor de água da biomembrana carregada com 17% de extrato de alho ($64,31 \pm 10,29$ mg/cm²/h) e 26% ($64,75 \pm 17,47$ mg/cm²/h), os quais foram estatisticamente inferiores ao demonstrado pela biomembrana sem extrato (VEÍCULO; $200,32 \pm 30,9$ mg/cm²/h).

Figura 11 - Permeabilidade ao vapor de água da BioMemGalactoAs

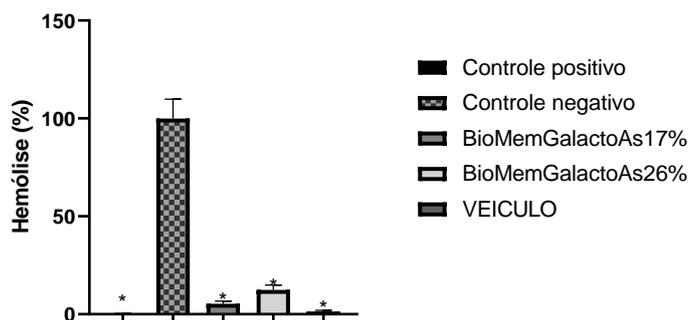


As barras representam média±desvio padrão da permeabilidade ao vapor de água expressa em mg/mc²/h da biomembrana sem extrato (veiculo), biomembrana com 17% e 26% de extrato. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparação entre as médias, *p<0,001 quando comparado ao VEICULO.

5.2.4 Atividade hemolítica

Os ensaios de compatibilidade sanguínea mostraram que tanto a biomembrana carregada com o extrato quanto a biomembrana sem extrato apresentaram valores menores quando comparados ao controle negativo (amostras de sangue misturadas com água destilada) e não apresentaram diferença quando comparadas ao controle positivo (amostras de sangue misturadas com solução salina 0,9%).

Figura 12 - Atividade hemolítica da BioMemGalactoAs



As barras representam média±desvio padrão da porcentagem de hemólise da biomembrana sem extrato (veiculo), biomembrana com 17% e 26% de extrato. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparação entre as médias, *p<0,00001 quando comparado ao Controle negativo.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

5.3.1 ABTS e DPPH

Frequentemente, o poder antioxidante de agentes em neutralizar os radicais DPPH é atribuído à sua capacidade de fornecer hidrogênio. A interação entre os antioxidantes e o DPPH está intrinsecamente ligada à estrutura molecular desses compostos. Além disso, a presença de grupos hidroxila em determinadas moléculas pode acelerar a reação com o radical DPPH, conforme observado por DE OLIVEIRA *et al.* em 2022. Da mesma forma, o método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) é empregado para avaliar a capacidade antioxidante, baseando-se na produção de um radical estável de cor azul-verde, que diminui na presença de antioxidantes, indicando sua eficácia. Esse método é reconhecido pela sua aplicabilidade universal a sistemas aquosos e lipofílicos, assim como pela sua resposta rápida e sensibilidade, como destacado por WOŁOSIAK *et al.* em 2021.

As soluções filmogênicas da biomembrana 17% e 26%, bem como a solução sem adição de extrato e o extrato sozinho foram avaliados quanto a sua capacidade inibitória dos radicais DPPH e ABTS⁺, a solução filmogênica de 17% foi a que demonstrou concentração inibitória (CI₅₀) mais efetiva, registrando 8,97±0,74 µg.mL⁻¹ no teste de inibição do radical DPPH. No teste ABTS⁺, a solução filmogênica a 26% apresentou CI₅₀ mais efetiva (13,20 ± 0,31). Com base na literatura (Kuefe e Efferth, 2010), pode-se afirmar que as amostras possuem uma elevada atividade antioxidante (CI₅₀ < 50 µg.mL⁻¹).

Tabela 4 - Concentração inibitória média através do método DPPH e ABTS

Amostras	CI ₅₀ DPPH (µg.mL ⁻¹)	CI ₅₀ ABTS ⁺ (µg.mL ⁻¹)
Quercetina (padrão)	2,74 ± 0,08	3,98 ± 0,13
Ácido gálico (padrão)	1,94 ± 0,27	13,01 ± 0,03
Solução gal + ext 17%	8,97 ± 0,74	16,85 ± 0,41
Solução gal + ext 26%	11,97 ± 0,54	13,20 ± 0,31
Solução gal	17,65 ± 0,35	17,32 ± 0,36

Extrato bruto <i>A. sativum</i>	11,02 ± 0,62	14,73 ± 0,29
CI ₅₀ – concentração inibitória média		

Fonte: Autor, 2024.

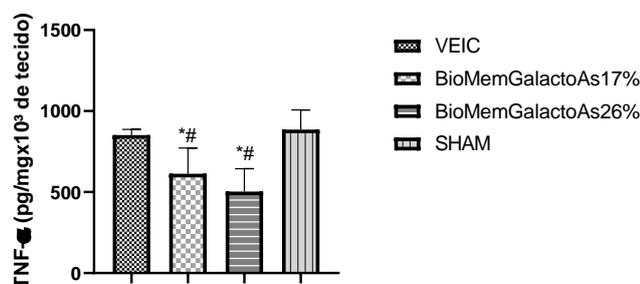
5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS FERIDAS EXCISIONAIS

5.4.1 Quantificação de citocinas inflamatórias

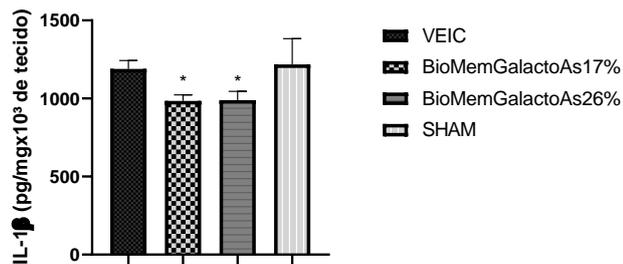
Nas figuras a seguir estão demonstrados os valores das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 quantificados por ELISA no tecido das feridas coletados no 2º dia após a indução. O tratamento das feridas com a biomembrana contendo extrato de *A. sativum* nas duas concentrações (17 e 26%) foi eficiente em reduzir de forma significativa a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido lesionado quando comparado com os valores destas citocinas em feridas tratadas somente com salina (SHAM). O tratamento com a biomembrana sem o extrato de *A. sativum* (VEIC) não promoveu redução dos níveis destas citocinas (Figura 13A, 15B e 15C). Por outro lado, a liberação de IL-10, citocina antiinflamatória foi significativamente maior nas feridas tratadas com a biomembrana nas duas concentrações em relação ao grupo SHAM. (Fig 11D).

Figura 13 - Efeito da BioMemGalactoAs sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e IL-10

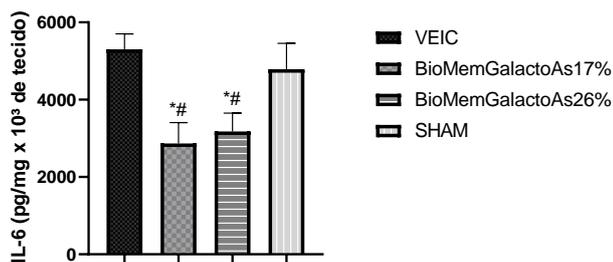
A



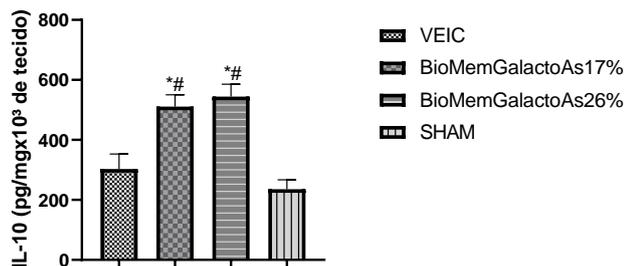
B



C



D



As barras representam os valores teciduais (picograma/mg 10³ de tecido) das citocinas expressos pela média \pm desvio padrão. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre as médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo com feridas não tratadas, (SHAM) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo com feridas tratadas com a biomembrana sem extrato (VEIC).

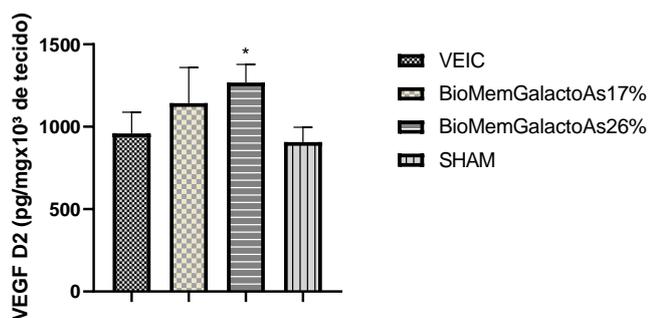
5.4.2 Fator de crescimento

Amostras de tecido coletadas nos três períodos experimentais (dias 2, 7 e 14) foram utilizadas para dosagem dos níveis de VEGF por ELISA. No 2º dia o grupo BioMemGalactoAs26% apresentou níveis mais altos de VEGF (Figura 14A). No 7º dia experimental os tratamentos com as biomembranas mantiveram os níveis do fator de

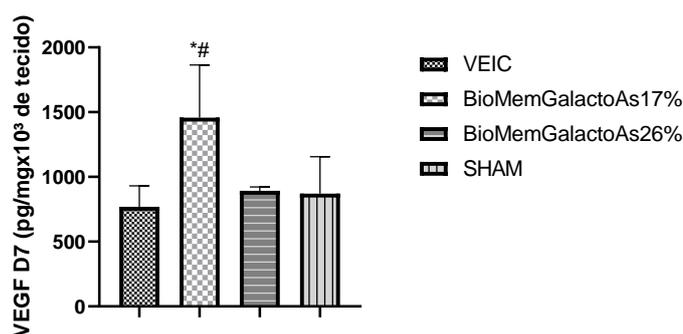
crescimento, havendo aumento maior no grupo BioMemGalactoAs17%, que diferiu estatisticamente dos grupos SHAM e VEIC (Figura 14B). No último dia experimental os níveis se mantiveram e não houve diferença entre os grupos (Figura 14C).

Figura 14 - Efeito da BioMemGalactoAs sobre os níveis de VEGF

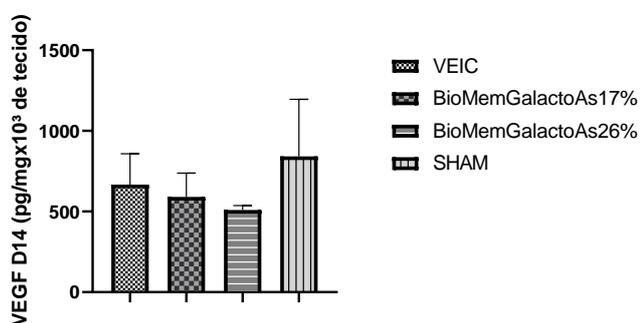
A



B



C



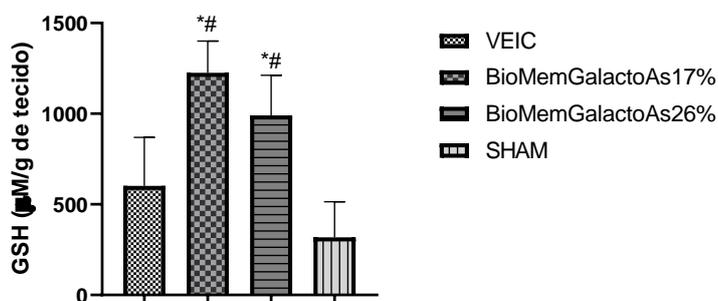
As barras representam os valores teciduais (picograma/mg 10³ de tecido) das citocinas expressos pela média±desvio. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre as médias. *p<0,05 representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo com feridas não tratadas, (SHAM) e #p<0,05 em relação ao grupo com feridas tratadas com a biomembrana sem extrato (VEIC).

5.4.3 Estresse oxidativo

As amostras de tecido coletadas no 2º dia foram analisadas quanto aos níveis de marcadores de estresse oxidativo, malondialdeído (MDA) e do efeito antioxidante com a glutationa reduzida (GSH). O tratamento com a biomembrana aumentou significativamente os níveis de GSH, com valores de $p < 0,0001$ para o grupo BioMemGalactoAs17% e $p < 0,005$ para o grupo BioMemGalactoAs26% quando comparados com o grupo SHAM, também sendo estatisticamente diferente do grupo VEIC.

Ao avaliar os níveis de MDA nas amostras coletadas no dia 2, os resultados mostram que há uma diminuição nos grupos tratados com a biomembrana (17 e 26%) em comparação com o grupo SHAM (Figura 16A). Com o intuito de avaliar se a resposta ao estresse oxidativo continuaria, as amostras coletadas no 7º dia também foram submetidas ao TBARS e os resultados mostraram que apenas o grupo tratado com a BioMemGalactoAs17% apresenta tendência de continuidade no efeito protetor contra a peroxidação lipídica (Figura 16B).

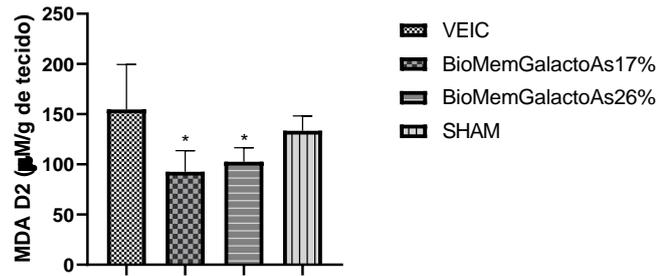
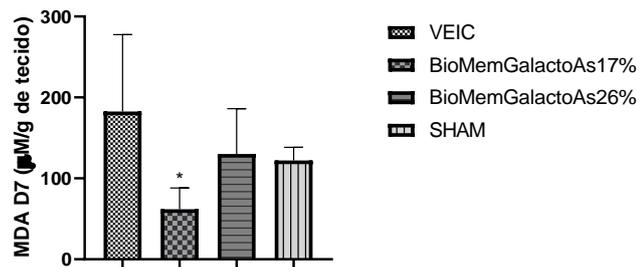
Figura 15 - Efeito da BioMemGalactoAs sobre os níveis de GSH



As barras representam os valores teciduais ($\mu\text{M/g}$ de tecido) de GSH expressos pela média \pm desvio. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre as médias. * $p < 0,001$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo com feridas não tratadas, (SHAM) e # $p < 0,001$ em relação ao grupo com feridas tratadas com a biomembrana sem extrato (VEIC).

Figura 16 - Efeito da BioMemGalactoAs sobre os níveis de MDA

A

**B**

As barras representam os valores teciduais ($\mu\text{M/g}$ de tecido) de MDA expressos pela média \pm desvio. O teste t de Welch foi utilizado para comparações entre as médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SHAM, # $p < 0,05$ em relação ao grupo VEIC.

6 DISCUSSÃO

O alho vem sendo utilizado para fins medicinais conhecidamente desde a idade média, conforme demonstrado em escritos antigos da China, Egito, Grécia e Índia. Em alguns países ocidentais, as vendas de preparações de alho são comparáveis às de medicamentos tradicionais (Cardelle-Cobas *et al.*, 2009; Bayan *et al.*, 2014).

Por esses motivos é considerado um dos 20 vegetais mais importantes e com várias utilizações em todo mundo na medicina tradicional e moderna, bem como vegetal para fins culinários (Lenková *et al.*, 2016). Suas propriedades medicinais são atribuídas a sua rica composição química que é influenciada pela variedade, condições de cultivo, fertilização, e também pela forma de armazenamento e preparo (Čeryová *et al.*, 2021).

De acordo com estudo de Santhosha e colaboradores (2013) o alho fresco contém aproximadamente 63% de água, 28% de carboidratos, 2% de proteínas, 1,2% de aminoácidos livres e 1,5% de fibras, esses teores podem variar de acordo com o tipo de extrato e tratamento feito, pois esses compostos estão sujeitos a hidrólise e condensação, como acontece por exemplo na formação da alicina, onde a alinase lisa rapidamente a alina para formá-la, da mesma forma que a alicina e outros tiosulfínatos são imediatamente decompostos em outros compostos como ajoeno, sulfeto de dialila, e outros compostos (Corzo-Martinez *et al.*, 2007; Amagase, 2006). Outro estudo relatou aproximadamente 65% de água, 28% de carboidratos, 2,3% de organossulfurados, 2% de proteínas, 1,2% de aminoácidos livres e 1,5% de fibra no alho (Oosthuizen *et al.*, 2018).

A correlação entre a composição do alho reportada na literatura e os dados analisados no extrato utilizado no presente estudo são notáveis. A similaridade na porcentagem de água, com 67,68% encontrada no extrato bruto de *A. sativum* em comparação com aproximadamente 63% no alho fresco, evidencia a preservação da matriz aquosa do alho durante o processo de extração principalmente por tratar-se de um extrato bruto com mínimo processamento. Além disso, a alta concentração de carboidratos identificada no extrato ($192,642 \pm 4,541$ mg/mL), juntamente com a descoberta de que 39,3% dos metabólitos analisados na análise metabolômica são carboidratos, reflete a composição relatada de 28% de carboidratos no alho fresco, sublinhando a importância dos frutanos e outros carboidratos como componentes chave. A detecção de proteínas ($0,570 \pm 0,020$ mg/mL) e a significativa presença de aminoácidos

(29,6% dos metabólitos identificados) no extrato corroboram a relevância das proteínas e aminoácidos livres, como a aliinase e a arginina, encontrados no alho, reforçando a complexidade bioquímica e o potencial terapêutico do extrato. Esses achados são particularmente interessantes ao considerar a transformação bioquímica da aliína em alicina e a subsequente geração de uma diversidade de compostos organossulfurados voláteis e bioativos, como o sulfeto de dialila, ditiínas e ajoeno, destacando assim a capacidade do alho de produzir compostos com significativo potencial terapêutico.

Os metabólitos secundários desempenham papéis cruciais na biologia das plantas, oferecendo uma gama de funções ecológicas e fisiológicas. Esses compostos, que incluem alcaloides, terpenoides, fenóis e glicosídeos, são essenciais para a planta em sua interação com o ambiente, atuando como defensores contra herbívoros, patógenos e competidores, além de facilitar a polinização e a dispersão de sementes. Além de seu papel ecológico, os metabólitos secundários possuem uma importância biológica significativa em aplicações médicas e farmacológicas, oferecendo propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Estudos têm demonstrado a capacidade desses compostos em modular vias metabólicas e sinalizações celulares em humanos, contribuindo para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias (Singh, *et al.*, 2021; Li, *et al.*, 2020).

Na análise da presença de metabólitos secundários do extrato bruto de *A. sativum*, foi identificada presença de cumarinas, taninos condensados, terpenóides e esteroides e não foi verificada presença de saponinas, reafirmando assim o potencial biológico desse extrato. Cumarinas e terpenóides, por exemplo, têm sido amplamente estudados por suas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. As cumarinas são conhecidas por sua capacidade de modular vias de sinalização celular e apresentar efeitos benéficos em doenças cardiovasculares e na coagulação sanguínea (Kumar & Pandey, 2013; Bourgaud *et al.*, 2006). Terpenóides, que compreendem uma vasta classe de compostos, são reconhecidos por sua versatilidade funcional, incluindo ação anticancerígena e de proteção hepática (Dewick, 2002; Paduch *et al.*, 2007). Por outro lado, taninos condensados e esteroides contribuem para o espectro de atividades biológicas do alho, incluindo propriedades adstringentes, anti-inflamatórias e a habilidade de influenciar o metabolismo lipídico e hormonal. Taninos, em particular, têm mostrado potencial em promover a saúde do trato gastrointestinal e em reduzir a peroxidação lipídica, oferecendo proteção contra diversas

doenças degenerativas (Haslam, 1996; Scalbert, 1991). Esteróides, incluindo fitosteróis presentes no alho, são conhecidos por suas capacidades de reduzir o colesterol LDL e melhorar a saúde cardiovascular (Moreau *et al.*, 2002).

Outro metabólito secundário de grande relevância biológica são os compostos fenólicos. Já foi apontado na literatura uma correlação positiva entre o teor de polifenóis em extratos e suas atividades biológicas (POP *et al.*, 2023). Segundo estudo de Lanzotti *et al* (2014), o alho tem concentrações mais elevadas de compostos fenólicos que outros vegetais que são consumidos regularmente.

No presente estudo o teor de compostos fenólicos encontrados no extrato foi de $43,32 \pm 3,97$ mg GAE/g. Um estudo desenvolvido por Beato *et al* (2011) analisou dez cultivares de alho cultivadas em quatro locais diferentes e o conteúdo fenólico total variou de 3,4 mg GAE/g a 10,8 mg GAE/g, com valor médio de 6,5 mg GAE/g. Outro estudo que compara o teor de polifenóis em amostras de alho convencionais e orgânicas obteve 3,05 e 4,45 g GAE/100g DW, respectivamente (Czech *et al.*, 2022). A discrepância de valores observada em estudos diferentes pode ser atribuída a diversos fatores, como a diferentes condições de cultivo, métodos de extração e análise, ou mesmo a variação genética entre as cultivares, isto reforça a importância de considerar condições específicas sob as quais os vegetais são cultivados e processados, bem como a metodologia de extração utilizada.

Outro ponto a se destacar é o elevado teor de compostos fenólicos observados neste estudo, apontando para um potencial antioxidante maior, visto que esses compostos são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, capazes de neutralizar radicais livres e, conseqüentemente, mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo, um fator contribuinte para o desenvolvimento de doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Pandey & Rizvi, 2009; Rice-Evans *et al.*, 1997). Essa ação antioxidante, juntamente com efeitos anti-inflamatórios e a capacidade de modular vias de sinalização celular, posiciona os compostos fenólicos como agentes promissores na prevenção e tratamento de diversas condições de saúde, incluindo a modulação de diversos fatores promovendo um ambiente propício à regeneração tecidual (Kumar & Pandey, 2013; Pezzuto, 1997).

Ariga (2006) destaca a capacidade dos compostos sulfurados do alho, que são categorizados sob compostos fenólicos, em acelerar a cicatrização de feridas através

de suas propriedades antioxidantes e de estimulação do sistema imunológico. Da mesma forma, Banerjee *et al.* (2001) demonstraram que o extrato de alho pode efetivamente promover a cicatrização de feridas em ratos, atribuindo essa capacidade aos polifenóis presentes. Além disso, Shukla e Kalra (2007) relataram que o alho exerce efeitos benéficos na cicatrização de feridas e na regeneração de tecidos, graças aos seus componentes fenólicos.

A análise metabolômica do extrato bruto de *A. sativum* permitiu identificar 55 metabólitos, destacando sua composição rica em aminoácidos como serina, prolina, glicina, treonina, cisteína, metionina, triptofano, glutamina, asparagina, ornitina e isoleucina, revelando seu potencial terapêutico, pois esses aminoácidos desempenham funções vitais na reparação tecidual e na síntese de colágeno, fundamentais para a estrutura e a função da pele em regeneração. A prolina, especificamente, é reconhecida por seu papel crucial na síntese de colágeno, enquanto glicina e cisteína contribuem para a regulação antioxidante, crucial para proteger as células contra danos durante o processo de cicatrização (Witte & Barbul, 2003; Patel *et al.*, 2012). Além disso, ácidos orgânicos identificados, como o ácido pirúvico e o ácido fumárico, estão envolvidos em vias metabólicas que fornecem a energia necessária para os processos celulares de reparação e regeneração, sublinhando a importância metabólica destes componentes no contexto da cicatrização de feridas (Shen *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a presença de espermidina no extrato sugere um papel na promoção da autofagia e na regulação do crescimento celular, mecanismos essenciais para a eliminação eficiente de células danificadas e para a subsequente regeneração de tecidos saudáveis (Madeo *et al.*, 2010). Essa atividade pode ser particularmente relevante no contexto da cicatrização, onde a remoção oportuna de detritos celulares e a restauração da integridade tecidual são críticas. Assim, a caracterização do perfil metabólico do extrato bruto de alho não apenas revela sua rica composição bioquímica, mas também fornece insights sobre os possíveis mecanismos moleculares e celulares pelos quais pode favorecer o processo de cicatrização.

A modulação do processo cicatricial é uma atividade complexa e envolve múltiplos fatores. A escolha do curativo e/ou cobertura ideal é um aspecto fundamental no manejo desse processo, pois, diferente do que se possa imaginar, ele não age apenas acelerando o fechamento da ferida, mas também criando um ambiente favorável para que isto aconteça. Existem diversos tipos de curativos, cada um projetado para atender

necessidades específicas do processo de cicatrização, que varia conforme o tipo e a fase da ferida. Curativos hidrocoloides, por exemplo, são amplamente utilizados para manter um ambiente úmido na área da ferida, acelerando o processo de cicatrização por promoverem a autólise e protegerem a ferida de contaminações externas. Eles são ideais para feridas com pouca ou nenhuma exsudação e ajudam na cicatrização de úlceras de pressão e queimaduras superficiais (Broussard e Powers, 2013; Boateng *et al.*, 2008).

Curativos de alginato, por outro lado, são feitos a partir de algas marrons e são especialmente úteis em feridas exsudativas, atuando na absorção de exsudato e na formação de um gel que mantém o ambiente úmido. Essa categoria de curativos é conhecida por sua capacidade de troca iônica, que auxilia na descontaminação da ferida e promove a cicatrização. Além disso, curativos de espuma oferecem outra opção, proporcionando absorção de exsudato moderado a alto, mantendo um ambiente de cicatrização úmido e protegendo a ferida contra trauma mecânico (Jones *et al.*, 2006; Thomas, 2015).

Avanços recentes na tecnologia de curativos introduziram curativos bioativos e biomiméticos, que não apenas fornecem um ambiente de cicatrização ideal, mas também interagem ativamente com o tecido da ferida para promover a regeneração. Curativos com peptídeos bioativos, células-tronco e fatores de crescimento são alguns exemplos que estimulam o processo de cicatrização ao nível celular e molecular, direcionando a proliferação celular, a migração e a angiogênese (Moura *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2023). O uso de biomateriais na indústria farmacêutica tem revolucionado o desenvolvimento de novas terapias, possibilitando a criação de sistemas de entrega de fármacos mais eficientes e biocompatíveis (Kumari *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2012).

Além disso, biomateriais de origem vegetal têm emergido como alternativas promissoras para a cicatrização de feridas, aproveitando as propriedades regenerativas e biocompatíveis de componentes naturais que devido a sua capacidade de formar filmes e géis que mantem o ambiente da ferida úmido, favorecendo o processo de cicatrização promovendo um ambiente ideal para a regeneração tecidual, além de serem biodegradáveis e minimamente invasivos, reduzindo assim o risco de reações adversas (Fontana *et al.*, 2016; Picheth *et al.*, 2017). A incorporação de extratos vegetais com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias nesses biomateriais também tem mostrado melhorar significativamente a eficácia dos curativos, oferecendo não apenas suporte estrutural, mas também atuando ativamente no controle da infecção e na

modulação da inflamação durante o processo de cicatrização (Silva *et al.*, 2014; Boateng *et al.*, 2008).

Coberturas de feridas feitas à base de galactomanana representam uma inovação significativa, pois as propriedades desse polissacarídeo em absorver água e formar géis o tornam ideal para criar ambientes de cicatrização úmidos e que promovam a regeneração tecidual, já tendo sido utilizado na composição de hidrogéis com proteínas do látex da *Calotropis procera* apresentando efeitos cicatrizantes (Vasconcelos *et al.*, 2017).

A extensão da permeabilidade ao vapor de água mostra indiretamente a capacidade dos curativos de facilitar a troca gasosa (Ehterami *et al.*, 2018). Nosso estudo mostrou que a biomembrana pode permitir a troca gasosa no período de incubação, a biomembrana sem adição de extrato tem uma capacidade de permeabilidade bem maior que a biomembrana em que o extrato foi incorporado, nos levando a inferir que o extrato foi capaz de interagir com a estrutura do polissacarídeo ocupando o espaço de alguns poros, porém esse efeito ainda foi suficiente para manter a umidade em níveis ideais, pois, na avaliação macroscópica nenhuma das feridas apresentou sinais de maceração (dados não apresentados).

A capacidade de absorção de umidade da biomembrana reflete a interação sinérgica entre os componentes da biomembrana e os líquidos com os quais ela entra em contato. A absorção máxima de $6,37 \pm 1,36\%$ em SBF e $8,42 \pm 2,95\%$ em PBS pela biomembrana sem adição de extrato pode ser atribuído às propriedades hidrofílicas da galactomanana e às propriedades higroscópicas da glicerina. Esses componentes facilitam a absorção e retenção de água através da formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água. A adição do extrato bruto de *A. sativum* modifica essa capacidade de inchaço devido as suas propriedades químicas que podem interagir com a matriz polissacarídica da galactomanana e glicerina afetando sua capacidade de formar pontes de hidrogênio.

A hemostasia faz parte da primeira fase da cicatrização e corresponde ao momento no qual o sangramento é interrompido através de vasoconstrição, formação de tampão plaquetário e coagulação do sangue para formar um tampão estável (Meephasan *et al.*, 2017). Estudos indicam que os compostos encontrados no alho, como a alicina, possuem propriedades que podem influenciar a coagulação sanguínea e a função plaquetária. A alicina, em particular, demonstrou ter efeitos tanto na agregação

plaquetária quanto nos mecanismos de coagulação, sugerindo que o extrato de alho pode contribuir para a estabilização do sangramento e facilitar o processo inicial de cicatrização de feridas através da promoção da hemostasia (Borrelli *et al.*, 2007; Bayan *et al.*, 2014). A biomembrana possui alta hemocompatibilidade, como demonstrado neste estudo, indicando que é biocompatível e não causa danos significativos aos glóbulos vermelhos, isso é muito importante em aplicações médicas, especialmente em cobertura de feridas, onde a promoção da hemostasia sem causar danos adicionais às células sanguíneas é crucial.

Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do alho já são bem documentados na literatura, objetivando avaliar se a biomembrana de galactomanana seria um bom veículo para entrega do extrato e funcionaria como cobertura de feridas foi utilizado o modelo de ferida excisional em três períodos de estudo, 2º, 7º e 14º dias após a indução da ferida.

No 2º dia foram realizadas dosagens de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento como ELISA para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF. A biomembrana carregada com extrato bruto de *A. sativum* (17 e 26%) foi eficaz em reduzir o aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6, fato que não ocorreu no grupo VEIC que foi tratado somente com a biomembrana sem extrato, descartando o efeito *per si* do veículo. Quanto a IL-10, citocina anti-inflamatória, seus níveis se mantiveram reduzidos no grupo não tratado e os grupos tratados com a biomembrana (17 e 26%) aumentou a presença de IL-10.

A presença elevada de TNF- α , IL-1 β e IL-6 é típica da fase inicial da resposta inflamatória, onde essas citocinas atuam na ativação de células imunes, na indução da febre, na produção de mais mediadores inflamatórios e na estimulação da reparação tecidual. O TNF- α é uma citocina multifuncional que atua induzindo e controlando a inflamação e protegendo os tecidos contra infecções (Nosenko *et al.*, 2019). Em estudos realizados com camundongos foi demonstrado que a inibição local de TNF exerce efeito terapêutico em animais com feridas cutâneas crônicas que não cicatrizam e facilita a regeneração de camundongos diabéticos, provando que a inflamação excessiva mediada por TNF desacelera o processo de cicatrização e sua inibição produz efeitos positivos (Ashcroft *et al.*, 2012; Goren *et al.*, 2007; Nosenko *et al.*, 2019).

A IL-1 β é uma das citocinas mais antigas em termos de descoberta e estudos, sua via de sinalização está associada à ativação de uma cascata característica dos receptores Toll-like da imunidade inata. O efeito causado pela sua presença ou ausência varia de

acordo com o tipo de ferida, evidências indicam que a sua produção é essencial para prevenção de infecção nas feridas, fator característico em feridas orais, por exemplo, enquanto uma inflamação mediada por IL-1 na ausência de infecções e nas lesões cutâneas livres de patógenos conhecidos (SPF), que é o caso dos animais e feridas analisadas nesse estudo, atrasa o processo de reepitelização da pele (Nosenko *et al.*, 2019).

A IL-6 desempenha um papel crucial na transição da inflamação aguda para a crônica, influenciando tanto a resposta imune celular quanto a humoral. Estes mediadores pró-inflamatórios, quando em níveis elevados, podem contribuir para a persistência da inflamação, retardando o processo de cicatrização. Por outro lado, a Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que ajuda a regular a resposta inflamatória, promovendo a resolução da inflamação e facilitando a transição para as fases de reparação e cicatrização (Singer e Clark, 1999; Werner e Grose, 2003).

A eficácia da biomembrana em prevenir o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e aumentar o fator de crescimento de angiogênese (VEGF) pode ser atribuída às propriedades anti-inflamatórias conhecidas do *A. sativum*, que incluem a inibição da via de sinalização do NF- κ B, um fator de transcrição que regula a expressão de genes pró-inflamatórios (Borrelli *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2003). Além disso, o aumento dos níveis de IL-10 nos grupos tratados sugere que o extrato de *A. sativum* pode também contribuir para o anti-inflamatório, potencialmente acelerando a resolução da inflamação e promovendo um ambiente mais favorável para segunda fase da cicatrização, a proliferação celular e conseqüentemente o reparo tecidual. Este efeito sinérgico entre a modulação das citocinas inflamatórias e o estímulo à angiogênese, possivelmente mediado pelo VEGF, sublinha a importância de abordagens terapêuticas que visam equilibrar a resposta inflamatória durante a cicatrização de feridas (Detillion *et al.*, 2004; Kocyigit *et al.*, 2009).

VEGF é um importante fator de crescimento envolvido na mediação do processo cicatricial. O VEGF é fundamental para a angiogênese, garantindo o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes para o tecido em recuperação, sua importância na cicatrização é documentada, com estudos mostrando que a sua expressão elevada está diretamente associada à melhoria da formação de tecido granulatório e à aceleração da epitelização (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003).

Diante disso a presença de VEGF foi avaliada por ELISA nos dias 2, 7 e 14 após a indução da ferida. O aumento inicial de VEGF no grupo tratado com a BioMemGalacto26% no 2º dia sugere uma resposta acelerada à lesão, potencialmente devido à presença de agentes bioativos na biomembrana que estimulam a sinalização pró-angiogênica. Este achado é consistente com a literatura que descreve o VEGF como um fator crítico nas fases iniciais da cicatrização, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos para suprir o tecido lesionado com nutrientes e oxigênio necessários para a reparação (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Além disso, o papel do VEGF na mobilização de células progenitoras endoteliais contribui para a restauração do tecido danificado, reforçando a importância da sua regulação adequada durante a cicatrização (Asahara *et al.*, 1997).

No 7º dia, o pico de VEGF observado no grupo BioMemGalacto17% em comparação com os grupos SHAM e VEIC pode refletir uma fase crítica de remodelação tecidual, onde a angiogênese ainda é necessária para sustentar o processo de cicatrização. A manutenção dos níveis de VEGF pelos tratamentos com biomembranas sugere uma liberação controlada de fatores bioativos que continuam a favorecer o processo de reparo. Este padrão de expressão corrobora estudos anteriores que destacam a importância de manter a angiogênese em níveis otimizados para facilitar a cicatrização eficaz, evitando tanto a insuficiência quanto o excesso de formação de vasos sanguíneos, que podem levar a cicatrizes patológicas ou a cicatrização deficiente (Peplow & Baxter, 2012; Gurtner *et al.*, 2008).

Por fim, a estabilização dos níveis de VEGF no 14º dia em todos os grupos indica a conclusão da fase angiogênica da cicatrização e o início da maturação do tecido cicatricial. Este resultado está alinhado com a compreensão de que a diminuição da necessidade de angiogênese ocorre à medida que o tecido cicatricial se forma e amadurece, com estudos anteriores demonstrando a regressão de vasos sanguíneos recém-formados que não são mais necessários após a conclusão da reparação tecidual (Carmeliet, 2005; Sundberg *et al.*, 1997). A capacidade da biomembrana de modular os níveis de VEGF ao longo do tempo sugere um potencial terapêutico para o tratamento de feridas, proporcionando um ambiente favorável à cicatrização em todas as fases do processo.

Outro importante fator avaliado nesse estudo é o estresse oxidativo, que desempenha um papel dual no processo de cicatrização de feridas, agindo tanto como um

promotor necessário para o início da resposta inflamatória quanto como um potencial retardador da cicatrização quando desregulado. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em um estágio inicial após a lesão é crucial para a defesa contra patógenos e a sinalização celular que leva à atração de células imunológicas para o local da lesão (Sen e Roy, 2008). Essas EROs, geradas principalmente por neutrófilos e macrófagos, ajudam na eliminação de bactérias e detritos, além de participarem da ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de citocinas e fatores de crescimento essenciais para a cicatrização de feridas (Tandara e Mustoe, 2004).

Entretanto, um desequilíbrio na produção de EROs pode levar a um estresse oxidativo crônico, o que é prejudicial para o processo de cicatrização. O dano celular causado pelo excesso de EROs pode comprometer a integridade do tecido e atrasar a reparação, ao interferir na proliferação celular, na diferenciação e na síntese de componentes da matriz extracelular (Schäfer e Werner, 2008). Além disso, o estresse oxidativo prolongado pode exacerbar a resposta inflamatória, levando a uma cicatrização deficiente e ao desenvolvimento de cicatrizes patológicas (Gill e Parks, 2008). De modo que, a regulação do equilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do tecido é fundamental para uma cicatrização eficaz, ressaltando a importância de terapias antioxidantes que podem ajudar a mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo (Sies, 1997).

A investigação sobre o papel dos antioxidantes, tanto endógenos quanto exógenos, na cicatrização de feridas, oferece insights valiosos sobre como mitigar os efeitos negativos do estresse oxidativo (Sen *et al.*, 2002). Além disso, o desenvolvimento de biomateriais e curativos com propriedades antioxidantes incorporadas representa uma abordagem promissora para melhorar a cicatrização de feridas, ao fornecer um suporte direto para o controle do estresse oxidativo no local da lesão (Zhao *et al.*, 2016).

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, que desempenha um papel crucial na defesa antioxidante celular ao neutralizar radicais livres e peróxidos de lipídios; e malondialdeído (MDA), um marcador bem estabelecido de peroxidação lipídica e, por extensão, de dano tecidual induzido por estresse oxidativo foram avaliados neste estudo (Sen *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2016).

A significativa modulação desses marcadores nos grupos tratados (BioMemGalactoAs17% e BioMemGalacto35%) sugere que a biomembrana pode

efetivamente atenuar o estresse oxidativo no ambiente de cicatrização, promovendo um equilíbrio redox favorável à reparação tecidual. Este mecanismo é corroborado por estudos anteriores que demonstraram a importância de manter um ambiente redox equilibrado para a cicatrização eficaz de feridas, uma vez que tanto a deficiência quanto o excesso de reatividade oxidativa podem comprometer a regeneração do tecido (Tandara & Mustoe, 2004; Schäfer & Werner, 2008).

Curiosamente a capacidade inibitória dos radicais DPPH foi maior para a solução da BioMemGalacto17%, maior até que a capacidade do extrato sozinho, demonstrando possível efeito sinérgico da galactomamana com o extrato de *A. sativum*, achado que está alinhado com a modulação dos níveis de GSH e MDA, onde o grupo tratado com a BioMemGalacto17% foi capaz de aumentar os níveis de GSH de forma mais expressiva, e foi o único que manteve o efeito na redução dos níveis de MDA avaliados no 7º dia.

Estes achados estão em alinhamento com a necessidade de estratégias antioxidantes na gestão da cicatrização de feridas, visto que intervenções que reduzem o estresse oxidativo podem acelerar a reparação tecidual ao minimizar a inflamação e promover a regeneração celular (Gill & Parks, 2008; Sies, 1997).

Por fim, a continuidade do efeito protetor contra a peroxidação lipídica observado no 7º dia para o grupo tratado com a biomembrana de 17% reforça a durabilidade da resposta antioxidante induzida por esse tratamento. Isso sugere que os componentes ativos da biomembrana não apenas conferem uma proteção imediata contra o estresse oxidativo, mas também sustentam uma defesa antioxidante prolongada, o que é essencial para a fase de remodelação na cicatrização de feridas, onde o equilíbrio redox continua a ser um fator crítico para a regeneração efetiva do tecido (Murray e Burch, 1987; Sen *et al.*, 2002). Esses achados sublinham a importância de desenvolver terapias baseadas em biomateriais que incorporem antioxidantes naturais ou sintéticos, não apenas para mitigar o estresse oxidativo inicial, mas também para sustentar um ambiente propício à cicatrização ao longo de todo o processo de reparo.

7 CONCLUSÕES

Em resumo, biomembrana de galactomanana adicionada com extrato bruto de *A. sativum* em diferentes concentrações foi produzida, caracterizadas físico-quimicamente e avaliada no processo de cicatrização de feridas excisionais em camundongos. A capacidade de absorção de umidade da biomembrana não variou nas concentrações de extrato, diferentemente do teor de permeabilidade ao vapor de água que foi menor na biomembrana com extrato, porém essa diminuição não interferiu no processo de cicatrização e ela ainda apresentou boa hemocompatibilidade.

A biomembrana apresentou potencial efeito cicatrizante através da modulação da resposta inflamatória e do estresse oxidativo e aumento na liberação de VEGF. Portanto, espera-se que o potencial de cicatrização das biomembranas seja devido as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do extrato. Sugere-se que a biomembrana pode representar uma abordagem terapêutica coadjuvante interessante no tratamento de feridas e que biomembrana produzida com galactomanana e 17% de extrato de *A. sativum* se apresenta como melhor opção.

REFERÊNCIAS

- ABBRUZZESE, A. R.; DELAHA, E. C.; GARAGUSI, V. F. Absence of antimycobacterial synergism between garlic extract and antituberculosis drugs. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 8, p. 79-85, 1987.
- ALMEIDA, G. D.; *et al.* Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 34, n. 4, p. 487-492, 2013.
- AMAGASE, H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. **J Nutr.**, v. 131 p. 955s–62s, 2006.
- ANDRADE, C. T. *et al.* Solutions Properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gun. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 26, p. 181-185, 1999.
- ARDA, O.; KSÜGÜR G. N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clin Dermatol.** v. 32, n. 1, p. 3-13, 2014.
- ARIGA, T. The Antioxidant and Prooxidant Activities of Allicin and Other Thiosulfinates. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 3-4, p. 363-372, 2006.
- Asahara, T.; *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964-967, 1997.
- ASHCROFT G.S.; *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. **Wound Repair Regen.**,v. 20, p. 38–49, 2012.
- AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, v. 21, p. 551-556, 2002.
- BAHADORAN, P.; KARIMZADEH, R.; FAHAMI, F. Investigating the therapeutic effect of vaginal cream containing garlic and thyme compared to clotrimazole cream for the treatment of mycotic vaginitis. **IJNMR**, n. 15, special issue, p. 343-349, 2010.
- BALBINO, C. A.; *et al.* Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz J of Pharm Sci**, v. 41, n. 1, jan/mar., 2005.
- BANERJEE, S. K.; MUKHERJEE, P. K.; MAULIK, S. K. Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 2003.
- BANERJEE, S. K.; MUKHERJEE, P. K.; MAULIK, S. K. Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 1, p. 67-71, 2001.
- BARANOSKI, S.; AYELLO, E.A. Wound Care Essentials. In: _____. **Advances in Skin & Wound Care**, 1st ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 364-373.
- BATIHA, G. E.; *et al.* Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. **Nutrients**, v. 12, p. 872, 2020.
- BAYAN L.; KOULIVAND P. H; GORJI A. Garlic: A review of potential therapeutic effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2014.

- BEATO, V. M. *et al.* Changes in Phenolic Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) Owing to the Cultivar and Location of Growth. **Plant Food Hum Nutr**, v. 66, p. 218-223, 2011.
- BECKER, M. *et al.* Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 3, n. 4, p. 223–227, 2019.
- BOATENG, J.; *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.
- BORLINGHAUS, J.; *et al.* Allicin: Chemistry and Biological Properties. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12591-12618, 2014.
- BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; IZZO, A. A. Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 11, p. 1386-1397, 2007.
- BOURGAUD, F. *et al.* Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-259, 1976.
- BRAGA, R. C.; *et al.* Evaluation of caelsapinia pulcherrima endospermic gum as Affinity matrices for galactose-binding lectins interaction. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 54, n.2, p. 283-292, mar/apr., 2011.
- BUCKERIDGE, M. S. *et al.* Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 12, ed especial, p. 137-162, 2000.
- CARDELLE-COBAS A. Comprehensive survey of garlic functionality. In *Garlic Consumption and Health*. USA: Nova Science Publishers; 2009. pp. 1-60. ISBN 978-1607-41642-5
- CARDOSO, J. F. *et al.* Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependente. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, p. 890-896, 2007.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, 932-936, 2005.
- CARTER, M.J. Chronic wound prevalence and the associated cost of treatment in Medicare beneficiaries: changes between 2014 and 2019. **J Med Econ**: v. 26, n. 1, p. 894-901, 2023.
- CAVALITO, J.; *et al.* The Antibacterial Principle of *Allium sativum*. III. Its Precursor and “Essential Oil of Garlic”. **J, Am. Chem. Soc.**, v. 6, n. 67, p. 1032-1033, 1945.
- ČERYOVÁ N.; *et al.* The content of bioactive compounds and antioxidant activity of garlic (*Allium sativum* l.). **Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences.**; v. 15, p. 1104-1111, 2021.
- CHEN, W.; *et al.* Allicin-loaded chitosan/polyvinyl alcohol scaffolds as a potential wound dressing material to treat diabetic wounds: An in vitro and in vivo study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, 2021.

CHOWDHURY, B.; CHATTERJEE, B. P. Purification of a galactomannan from seeds of *Poiciana pulcherrima* Linn. usin jackfruit lectin immobilized Affinity adsorbent & its structural characterization. **Indian Journal of Chemistry**, n. 28, p. 637-641, 1987.

CORZO-MARTINEZ M.; *et al.* Biological properties of onions and garlic. **Trends Food Sci Technol.**, v.18, p. 609–25, 2007.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., & LEWIS, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.

CUI, S. W. *et al.* Synergisms between yellow mustard mucilage and galactomannans and applications in food products - a mini review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128-130, p. 249-256, 2006.

CUNHA, P. L. R.; *et al.* Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

CZECH, A.; SZMIGIELSKI, M.; SEMBRATOWICZ, I. Nutritional value and antioxidant capacity of organic and conventional vegetables of the genus *Allium*. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

DATILES, M. J.; ACEVEDO-RODRIGUEZ, P. *Caesalpinia pulcherrima* (peacock flower). **CABI Digital library**: 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/cabicompndium.10728>. Acesso em: 05 de março de 2024.

DE OLIVEIRA PRATA MENDONÇA, H. *et al.* Efeito hormese para estímulo na produção de brotos em *tectona grandis*: uma revisão. **Open Science Research IV**, v. 4, n. 1, p. 124-139, 2022.

DEA, I. C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Carbohydrates Research**, v. 31, p. 241-321, 1975.

DEEPIKA, S. *et al.* Screening bioactivities of *Caesalpinia pulcherrima* L. swartz and cytotoxicity of extract synthesized silver nanoparticles on HTC116 cell line. **Materials Science and Engineering: C**, v. 106, n. 110279, jan., 2020.

DETILLION, C. E.; *et al.* Social facilitation of wound healing. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 8, p. 1004-1011, 2004.

DEWICK, Paul. M. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 2 ed. Wiley, 2002.

DRAPER, H. H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DUNNILL, C.; *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, v.14, n. 1, p. 89-96, 2017.

EDWARDS, S.L. Innate Defences. In: MONTAGE, S.E.; WATSON, R.; HERBERT, R.A. **Physiology for nursing practice**. 3rd ed. Madrid: Elsevier, 2005. p. 635-683.

EHTERAMI, A.; *et al.* In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model.

Internacional Journal of Biological Macromolecules, v. 117, n. 1, p. 601-609, out., 2018.

EMING, S. A.; *et al.*. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6, 2014.

FARNOOD, S. S. J.; *et al.* The efficacy of alcoholic extract of garlic on the healing process of experimental burn wound in the rabbit. **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 8, n. 4, p. 655-659, 2009.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2004.

FONTANA, G.; *et al.* Bacterial cellulose: A versatile biopolymer for wound dressing applications. **DYNA**, v. 83, n. 197, p. 5-10, 2016.

FREITAS, C. E. P. *et al.* Obtenção e estudos de estabilidade de biohidrogéis de galactomanana aditivado com emulsão de óleo de abacate. **Braz. J. of Develop.**, v. 6, n. 7, p. 52280-52290, jul., 2020.

FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **J Cell Biol.** v. 180, n. 2, p. 273-284, 2008.

FUJIMI, S. *et al.* Murine dendritic cell antigen-presenting cell function is not altered by burn injury. **J Leuk Biol**, v. 85, 2009

GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 46, p. 133-140, 2014.

GOREN I.; *et al.* Systemic anti-TNF α treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, p. 2259–2267, 2007.

GORENKOVA, N.; *et al.* Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 129, 2013.

Gurtner, G.C.; *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

Harborne, A. J. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 3 ed. Springer Dordrecht, 1998.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-21, 1996.

INFANGER, M.; SHMIDT, O.; KOSSMEHL, P.; GRAD, S.; ERTEL, W.; GRIMM, D. Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. **Burns**, v. 30, n. 4, p. 305–311, 2004

ISSAC, C.; *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, jul/dez., 2010.

JANG, J. K.; LEE, O. S.; KANG, T. J.; LIM, S. C. Wound healing effect of cuttlebone extract in burn injury of rat. **Food Sci Biotechnol**, v. 22, n. 5, p. 99–105, 2013.

- JONES, V.; GREY, J. E.; HARDING, K. G. **Wound dressings.**, v. 332, n. 754), p. 777-780, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. C. *Histologia Básica: texto e atlas*. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- KUETE, V.; EFFERTH, T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. **Frontiers in pharmacology**, v. 1, p. 123, 2010.
- KUETE, Victor. *Allium sativum*. In: KUETE, Victor. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*: Elsevier, 2017. Cap. 15, p. 363-377.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, v. 162750, 2013.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, v. 162750, 2013.
- KYLE, R. A.; SHAMPO, M. A. Johann Heller and the Nitric Acid Ring Test. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, n. 9, p. 955, 1988.
- LANZOTTI, V.; *et al.* Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytochem. Rev.**, v. 13, p. 769-791, 2014.
- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Revista da SPDV**, v. 69, n.3, p. 355-367, 2011.
- LEAL, E. C.; CARVALHO, E. Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 9, n. 3, p. 133-143, 2014.
- LEMOS, E. K. F. Avaliação e Caracterização de Membranas de Celulose Microcristalina Regenerada para uma Potencial Aplicação em Cicatrização de Feridas Crônicas. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Estadual de Minas Gerais, Ouro Preto, 2008.
- LENKOVÁ M.; *et al.* Evaluation and comparison of the content of total polyphenols and antioxidant activity of selected species of the genus *Allium*. **Journal of Central European Agriculture**, v. 17, n. 4, p. 1119-1133, 2016.
- LI, Yanqun *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387-96, 2006.
- LIU, T.; *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, p. e17023, 2014.
- LONDHE, V. P.; *et al.* Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: na overview. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion**, v. 1, n.4 p. 129-134, 2011.
- MADEO, F.; TAVERNARAKIS, N.; KROEMER, G. Can autophagy promote longevity? **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 842-846, 2010.

- MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276(5309), p. 75-81, 1997.
- MARTINEGO, L. *et al.* Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Ann Epidemiol**: v. 29, p. 8-15, 2019.
- MEEPHASAN, J.; *et al.* Effect of astaxanthin on cutaneous wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 2017, n. 10, p. 259-265, 2017.
- MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Na Bras Detmatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.
- MOHAMMAD, R. F.; *et al.* Hydroethanolic *Allium sativum* extract accelerates excision wound healing: evidence for roles of mast-cell infiltration and intracytoplasmic carbohydrate ratio. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 53, n. 1, p. e15079, 2017.
- MONTEIRO, A. A. S. Síntese e caracterização de géis de galactomanana de fava danta (*Dimorphandra gardneriana*) para aplicação biológica. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- MOREAU, R. A.; *et al.* Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 6, p. 457-500, 2002.
- MOURA, L. I. F.; *et al.* Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 7, p. 7093-7114, 2013.
- NARIMATSU, F. C.; *et al.* Avaliação in vitro da associação medicamentosa de extrato bruto de *Allium sativum* L. (alho) com Imipenem e Meropenem frente a cepas sensíveis de *Escherichia coli*. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 64, n. 3, p. 179-183, São Paulo. Set/dez., 2019.
- NETTER, Frank, H. Atlas de Anatomia Humana. 7 ed. Rio de Janeiro: GEN, 2021
- OLSSON, M.; *et al.* The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. **Wound Repair Regen**: v. 27, n. 1, p. 114-125, 2019.
- OOSTHUIZEN C. B. *et al.* Garlic (*Allium sativum*) and its associated molecules, as medicine. In: Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being. USA: Academic Press; 2018. pp. 277-295. ISBN 978-0-12-812475-8.
- PADUCH, R.; *et al.* Terpenes: Substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.
- PATEL S.; GOYAL A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **3 Biotech**: v. 2, n. 2, p. 116-25, 2012.
- PATEL S.; GOYAL A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **3 Biotech**: v. 2, n. 2, p. 116-25, 2012.
- PATTON, Kevin T.; THBODEAU, Gary A. Anatomy and Physiology. 1st ed: Elsevier, 2019.

PEPLOW, P. V.; BAXTER, G. D. Gene expression and release of growth factors during delayed wound healing: A review of studies in diabetic animals and possible combined laser phototherapy and growth factor treatment to enhance healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 11, p. 617-636, 2012.

PEZZUTO, J. M. Plant-derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 121-133, 1997.

Picheth, G. F.; *et al.* Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97-106, 2017.

PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, p. 1-5, 2017.

PIRIZ, M. A.; *et al.* Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev. Bras. PI. Med.**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 628-636. 2014.

POP, O. L. *et al.* Polyphenols ensured accessibility from food to the human metabolism by chemical and biotechnological treatments. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 865, 2023.

PRATI, P.; *et al.* Evaluation of allicin stability in processed garlic of different cultivars. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 623-628, jul./set., 2014.

PROKSCH, E.; *et al.* The skin: na indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REID, J. S. G. Cell Wall Storage Carbohydrates in Seeds – Biochemistry of the Seed “Gums” and “Hemicelluloses”. **Advances in Botanical Research**, v. 11, p. 125-153, 1985.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n.4, p. 152-159, 1997.

ROBERTS, A. B.; *et al.* Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 83, n. 12, p. 4167-4171, 1986.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, v. 13, p. 11-29, 2001.

SANTHOSHA S. G.; *et al.* Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: a review. **Food Biosci.** v. 2013, n. 3, p. 59–74, 2021.

SANTOS, E. C. M. Filmes biodegradáveis de galactomanana: uso na conservação de frutos. 2012. 145 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SANTOS, E. C. M. Preparação e caracterização físico-química e toxicológica de filmes comestíveis de colágeno-galactomanana para revestimento de frutos tropicais. 2007. 111

f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 165-171, 2008.

SCHULTZ, G. S. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, n. 3, p. 179-189, 2003.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEN, C. K. *et al.* Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair and Regeneration**, v.17, n. 6, p. 763-771, 2009.

SEN, C. K.; *et al.* Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: An emerging paradigm. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 239-249, 2002.

SEN, C.K.; ROY, S. Redox signals in wound healing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1348-1361, 2008.

SENDL, A. *Allium sativum* and *allium ursinum*: part 1. Chemistry, analysis, history, botany. **Phytomedicine**, v. 4, p. 323-339, 1995.

SHANG, A.; *et al.* Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). **Foods**, n. 8, v. 7, p. 245, 2019.

SHARMA P.; *et al.* A comprehensive review on leguminous galactomannans: structural analysis, functional properties, biosynthesis process and industrial applications. **Crit Rev Food Sci Nutr**: v. 62, n. 2, p. 443-465, 2022.

SHEN, T.; *et al.* Natural stilbenes: an overview. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 7, p. 916-935, 2009.

SHUKLA, Y.; KALRA, N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. **Cancer Letters**, v. 247, n. 2, p. 167-181, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, N. H. C. S.; *et al.* Natural-based biomaterials for skin wound healing. **Materials for Biomedical Engineering**, v. 2, p. 1-22, 2014.

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

SINGH, Priyanka *et al.* The role of quercetin in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 10-19, 2021.

SINGLETON, V. L. ; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16, 144–158, 1965.

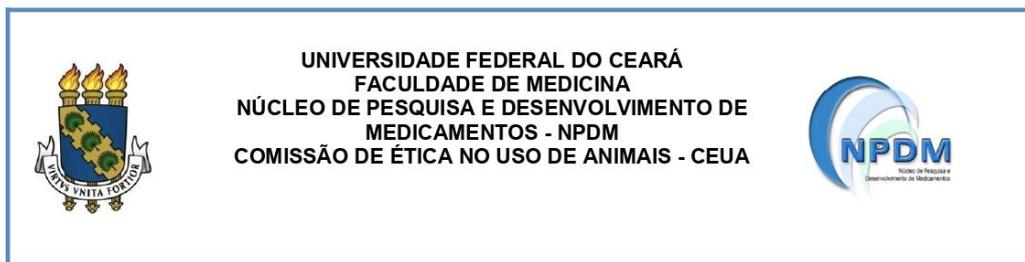
- SOUZA, C. A. G. *et al.* Encapsulação do ácido L-Ascórbico no biopolímero natural galactomanana por *spray-drying*: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Quim Nova**, v. 38, n. 7, p. 877-883, 2015.
- SOUZA, J.A. Key clinical evidence of stem cell therapy in burn healing: a systematic review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. e184111032781, 2022.
- SRINIVAS, K. V. N. S. *et al.* Flavanoids from *Caelsapinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 789-793, 2003.
- SUNDBERG, C.; *et al.* Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. **Laboratory Investigation**, v. 76, n. 2, p. 223-230, 1997.
- TANDARA, A. A.; MUSTOE, T. A. Oxygen in wound healing—More than a nutrient. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 294-300, 2004.
- TAVARES, L.; *et al.* Bioactive compounds of garlic: A comprehensive review of encapsulation technologies, characterization of the encapsulated garlic compounds and their industrial applicability. **Trends in Food and Science & Technology**, v. 114, p. 232-244, 2021.
- TAZIMA, M. F. G. S.; *et al.* BIOLOGIA DA FERIDA E CICATRIZAÇÃO. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008.
- THOMAS, S. Alginate dressings in surgery and wound management—Part 1. **Journal of Wound Care**, v. 9, n. 2, p. 56-60, 2015.
- TOTTOLI, E. M.; *et al.* Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 735, 2020.
- UNRAU, A. M.; *et al.* Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 6, p. 496-511, 2008.
- USUI, M.L.; *et al.* Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. **Wound Repair Regen.** v. 13, p. 468–479, 2005.
- VASCONCELOS, M.S.; *et al.* A phytomodulatory hydrogel with enhanced healing effects. **Phytotherapy research**: v. 32, n. 4, p. 688-697, 2017.
- VIEIRA, C.P.B.; ARAUJO, T.M.E. Prevalência e fatores associados a feridas crônicas em idosos na atenção básica. **Rev Esc Enferm USP**: v. 52, n. e03415, 2018.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83 n. 3, p. 835-870, 2003.
- WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 92, n. 3, p. 657-678, 2012.
- WOŁOSIAK, R. *et al.* Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by ABTS and DPPH assays - A practical approach. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 50, 2021.
- YANG, L.; CHAN, T.; DEMAREM J.; IWASHINA, T.; GHAHARY, A.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Healing of Burn Wounds in Transgenic Mice Overexpressing Transforming Growth Factor- β 1 in the Epidermis. **Amer J of Pathol**, v. 159, n. 6, 2001.

ZAIA, D. A. M.; *et al.* **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** Química nova, 1998.

ZHAO, R.; *et al.* Inflammation in chronic wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2085, 2016.

ZOUBOULIS, C. C.; *et al.* Physiology and Pathophysiology of the Skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 3, p. 559-572, 2009.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS - NPDM
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada " ESTUDO DO EFEITO DE BIOFILMES DE GALACTOMANANA E *Allium sativum* EM MODELO DE CICATRIZAÇÃO ANIMAL" registrada com o protocolo **36200922-0**, sob a responsabilidade de **Nylane Maria Nunes de Alencar e Régia Karen Barbosa de Souza** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, 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), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 17/11/2022.

We hereby certify that the project entitled "STUDY OF THE EFFECT OF GALACTOMANAN AND *Allium sativum* BIOFILMS ON ANIMAL HEALING MODEL" identified by the protocol number **36200922-0**, and conducted by **Nylane Maria Nunes de Alencar e Régia Karen Barbosa de Souza** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 11/17/2022.

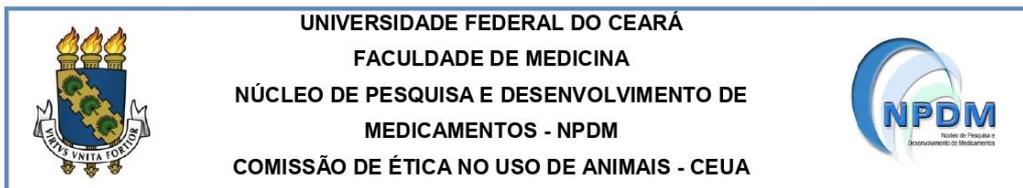
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: NOVEMBRO/2022 Fim: DEZEMBRO/2023
Espécie	Camundongo Heterogênico
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	120
Peso	22 gramas
Idade	8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM



Fortaleza, Ceará, 17 de novembro de 2022

Documento assinado digitalmente
gov.br LAIS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA
Data: 21/11/2022 15:33:35 -0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará



PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ADENDO DO PROJETO DE PESQUISA APROVADO PELA CEUA-NPDM SOB Nº: 36200922-0

I. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO: F36-2022

1. Título: ESTUDO DO EFEITO DE BIOFILMES DE GALACTOMANANA E *Allium sativum* EM MODELO DE CICATRIZAÇÃO ANIMAL
2. Pesquisador Responsável: Nylane Maria Nunes de Alencar
3. Colaborador Principal: Regia Karen Barbosa de Souza

II. OBJETO DO ADENDO: *Solicitação de 60 camundongos swiss*

III. BREVE DESCRIÇÃO DO ADENDO: Solicito a liberação de mais 60 camundongos da linhagem Swiss, pois será preciso repetir os protocolos devido a diferenças dos resultados obtidos comparados ao piloto, devido a uma alteração no método de extração do ativo incorporado ao biofilme, o que resultou em processo cicatricial inferior, fazendo-se necessário a repetição do protocolo, nas mesmas condições, além de permitir comparar variações nos efeitos do ativo dependentes do método de extração.

Nesse segundo protocolo de repetição os animais serão analisados quanto as características macroscópicas da lesão, histologia e mediadores inflamatórios, sendo realizadas duas lesões no dorso de cada animal (procedimento descrito no parecer de número 36200922-0) e eles serão divididos nos seguintes grupos:

1. Sham (15 animais): animais serão submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não receberão nenhum tipo de tratamento, somente limpeza diária com solução salina 0,9%;
2. Biofilme de galactomanana (15 animais): animais serão submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação do biofilme de galactomanana;
3. Biofilme de galactomanana-alho 0,5 (15 animais): animais serão submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação do biofilme na concentração de 5%;
4. Biofilme de galactomanana-alho 1 (15 animais): animais serão submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação do biofilme na concentração de 10%.

IV. PARECER DA CEUA:

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do NPDM da Universidade Federal do Ceará **APROVOU** adendo referente ao projeto de pesquisa supracitado em reunião extraordinária realizada em 21 de Setembro de 2023.

Reiteramos que esse Parecer Consubstanciado só terá validade se apresentado juntamente com o Certificado de Aprovação do Projeto de Pesquisa objeto do adendo.

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

ANEXO II

Tabela 1 – Reagentes para a solução de PBS

REAGENTES	QUANTIDADE
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g

Fonte: Lemos, 2008.

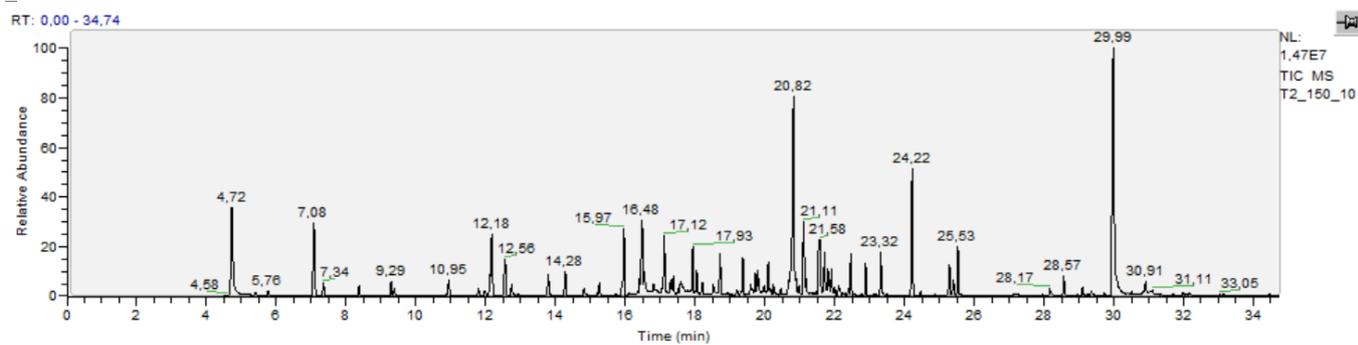
Tabela 2 – Reagentes para SBF

ORDEM	REAGENTES	QUANTIDADE
1°	NaCl	7,9960g
2°	NaHCO ₃	0,3500g
3°	KCl	0,2240g
4°	K ₂ HPO ₄	0,1740g
5°	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,3050g
6°	HCl	40ml
7°	CaCl ₂	0,2780g
8°	NaSO ₄	0,0710g
9°	TRIS	6,0570g

Fonte: Lemos, 2008.

ANEXO III

Figura 17 - Cromatograma



Cromatograma do extrato bruto de *A. sativum* submetido a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Fonte: Autor, 2024.