

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

GISELE DE OLIVEIRA KRUBNIKI POSSA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE UM HIDROGEL
DE ALGINATO COM EXTRATO DE CALÊNDULA

PONTA GROSSA
2023

GISELE DE OLIVEIRA KRUBNIKI POSSA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE UM HIDROGEL
DE ALGINATO COM EXTRATO DE CALÊNDULA

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira

PONTA GROSSA
2023

P85 Possa, Gisele de Oliveira Krubniki
Desenvolvimento e avaliação da citotoxicidade de um hidrogel de alginato
com extrato de calêndula / Gisele de Oliveira Krubniki Possa. Ponta Grossa, 2023
71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira. Coorientadora:
Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa.

1. Cicatrização. 2. Hidrogel. 3. Fitoterápico. 4. Calêndula. 5. Alginato. I. Pereira,
Airton Vicente. II. Costa, Michele Dietrich Moura. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. IV. T.

CDD:

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 02/2023, DA MESTRANDA GISELE DE OLIVEIRA KRUBNIKI POSSA, REALIZADA NO DIA 23 DE MARÇO DE 2023, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e três dias de março de dois mil e vinte e três, às 10h00 min., através de videoconferência pelo Google Meet, em sessão pública gravada e sob a presidência do Prof. Dr. Airton Vicente Pereira reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Gisele de Oliveira Krubniki Possa** na linha de pesquisa: Pesquisa de compostos com atividade biológica, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Profa Dra Iriane Eger (UEPG/PR) e Profa Dra Jaqueline Carneiro (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Desenvolvimento e avaliação da citotoxicidade de hidrogel de alginato com extrato de calêndula”**. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado da avaliação da dissertação como **APROVADA**. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, a aluna terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: não



Prof. Dr. Airton Vicente Pereira (DEFAR - UEPG) – Presidente



Profa Dra Iriane Eger (DEBIOGEM - UEPG) – Titular



Profa Dra Jaqueline Carneiro (UFPR/PR) – Titular

Ponta Grossa, 23 de Março de 2023

AGRADECIMENTOS

No decorrer dos anos de mestrado, de muito estudo, esforço e dedicação, não poderia deixar de expressar a minha sincera gratidão para aqueles que foram peças chave para a concretização de mais esta etapa em minha vida.

Primeiramente, agradeço a Deus que me proporcionou a oportunidade de realizar esse sonho, que desde o início vem abrindo portas e permitindo que as coisas aconteçam da melhor maneira. Obrigada pelas bênçãos e força para concluir este mestrado.

Aos meus pais, Sandro e Vilma, que sempre vibraram por cada conquista, acreditaram no meu potencial e me deram suporte emocional e financeiro. A vocês minha eterna gratidão por me ajudar a superar os obstáculos da vida e principalmente pelo amor imenso. Sem o incentivo de vocês isso jamais seria possível! Tudo que sou, devo a vocês!

Ao meu marido, Rodrigo, que diariamente me encoraja a ir mais longe e que acredita em mim mais do que eu mesma! Obrigada pela sua paciência e compreensão, sem seu companheirismo e carinho a jornada seria muito mais árdua. Amo você!

Obrigada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas, aos docentes, em especial à Profa. Michele que prontamente me acolheu e não mediu esforços para que esse trabalho acontecesse. Ao meu orientador Prof. Airton agradeço por todo ensinamento, pela paciência e dedicação, mas principalmente por depositar sua confiança em mim. Você realmente tem o dom de ensinar!

Agradeço aos meus amigos, Talita e Luiz, que desde a faculdade me incentivam e me auxiliam. Obrigada por estarem sempre prontos a me ajudar e por fornecer material para a realização do meu experimento.

Gratidão também ao meu companheiro de laboratório, Gabriel, que chorou e sorriu comigo, me acolheu e me ajudou com os afazeres do laboratório.

Obrigada a minha companheira de trabalho, Danieli, que sempre me ouviu e proporcionou momentos durante o expediente para que eu pudesse estudar.

Enfim, obrigada a todos meus amigos que acreditaram, torceram e incentivaram essa jornada!

RESUMO

As feridas crônicas impactam consideravelmente na qualidade de vida dos pacientes. A aplicação de curativos é uma forma eficiente de tratar feridas, uma vez que protegem e auxiliam a cicatrização. Os hidrocolóides de alginato são materiais biocompatíveis que absorvem fluido formando um gel que mantém a umidade no leito da ferida, proporcionando um ambiente adequado para a proliferação celular. A incorporação de extratos de plantas medicinais pode potencializar a ação cicatrizante do alginato. *Calendula officinalis* L. contém flavonoides e triterpenos que possuem ação anti-inflamatória e atuam sobre a proliferação celular, favorecendo a cicatrização. O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar o efeito *in vitro* sobre viabilidade de fibroblastos de um hidrogel de alginato com extrato de calêndula. Os extratos glicólicos foram preparados utilizando flores secas de calêndula. As análises dos extratos utilizando espectrofotometria UV-visível e CLAE-DAD evidenciaram a presença de compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e as misturas propilenoglicol-água (10 a 30%) resultaram em maior eficiência na extração dessas classes químicas. O hidrogel alginato-calêndula foi submetido ao estudo de estabilidade, análise termogravimétrica (TG) e reologia. Os ensaios físico-químicos evidenciaram que a formulação é estável e possui pH compatível com a pele. As amostras mantidas sob refrigeração apresentaram maior estabilidade além de viscosidade e espalhabilidade mais adequadas ao uso tópico. Os ensaios reológicos demonstram a diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura, prevalecendo o caráter viscoso (G'') em baixas frequências. O efeito do hidrogel alginato-calêndula sobre viabilidade celular foi avaliado pelos testes com metiltetrazólio (MTT) e sulforodamina B (SRB) utilizando fibroblastos murinos da linhagem 3T3. Os resultados demonstram que a formulação de hidrogel alginato-calêndula não exerce efeito citotóxico. Através do ensaio da SRB observou-se um aumento da viabilidade celular nas diluições a partir de 1:80.

Palavras-chave: Cicatrização. Hidrogel. Fitoterápico. Calêndula. Alginato.

ABSTRACT

Chronic wounds significantly reduce a patient's quality of life. Wound dressing is an effective method of treating wounds and promoting healing. Alginate hydrocolloids are biocompatible and absorb exudate to form a gel, which creates a moist wound environment conducive to cell proliferation. The incorporation of herbal extracts into alginate hydrogels may have the potential to accelerate the healing process. *Calendula officinalis* L. contains flavonoids and triterpenes, which have been shown to have anti-inflammatory properties as well as cell proliferation, accelerating wound healing. The goal of this study was to create an alginate hydrogel containing marigold extract, characterize its physicochemical properties, and assess its effect on fibroblast viability in vitro. Dried marigold flowers were used to make glycolic extracts. Glycolic extract UV-visible spectrophotometry and HPLC-DAD analysis. The presence of phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids was revealed by UV-visible spectrophotometry and HPLC-DAD analysis of glycolic extract. Propylene glycol:water extracting solutions ranging from 10 to 30% (v/v) in water provided the best extracting solution for the preparation of glycolic extracts. Stability tests, thermogravimetric (TG) analysis, and rheology were performed on the alginate-calendula hydrogel. The physicochemical tests revealed that the formulation is stable, has a pH compatible with the skin, and samples stored at 4 °C during storage stability testing did not exhibit significant changes in pH, viscosity, or spreadability. The rheological tests show that viscosity decreases with increasing temperature, with the viscous character (G'') dominating at low frequencies. In murine fibroblasts 3T3 cells, cell viability was determined using methyl tetrazolium and sulforhodamine B assays. According to the findings, the alginate-calendula hydrogel formulation was not cytotoxic. The SRB assay revealed an increase in cell viability at dilutions beginning at 1:80.

Keywords: Healing. Hydrogel. Phytotherapeutic. Marigold. Alginate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do alginato com os blocos de (a) ácido D-manurônico (bloco M), (b) ácido L-gulurônico (bloco G) e (c) junção dos blocos M e G.....	18
Figura 2: Flores da espécie <i>Calendula officinalis</i>	20
Figura 3: Estrutura dos monoésteres do faradiol, onde R = lauril, miristil ou palmitil.	22
Figura 4: Estrutura dos flavonoides quercetina e rutina.....	22
Figura 5 – Imagens de microscopia óptica (400x) e microscopia eletrônica de cortes histológicos de pétalas de calêndula.....	35
Figura 6- Sistema de anel de flavonoides.....	38
Figura 7: Espectros UV-visível de extratos glicólicos de propilenoglicol com diferentes tamanhos de partículas das flores de calêndula.....	38
Figura 8: Espectros UV-visível de extratos glicólicos de calêndula com diferentes soluções extratoras.....	39
Figura 9: Curva de calibração da quercetina.....	40
Figura 10: <i>Fingerprint</i> CLAE-DAD típico de extrato glicólico de flores de calêndula e espectros dos compostos majoritários (1-11).....	42
Figura 11: <i>Fingerprint</i> CLAE-DAD demonstrando aumento da absorção com adição de padrão de rutina.....	43
Figura 12: pH do hidrogel alginato-calêndula em diferentes condições de armazenamento.....	47
Figura 13: Viscosidade de amostras do hidrogel alginato-calêndula em diferentes condições de armazenamento.....	48
Figura 14: Espalhabilidade do hidrogel acondicionado em diferentes temperaturas	50
Figura 15: Curvas termogravimétricas do hidrogel de alginato.....	51
Figura 16: Análise reológica oscilatória dos hidrogéis de alginato à 37 °C.....	53
Figura 17: Comportamento reológico do hidrogel de alginato e hidrogel alginato-calêndula com variação de temperatura de 5 a 45 °C.....	54
Figura 18: Viscosidade complexa do hidrogel alginato e hidrogel alginato-calêndula com variação de temperatura de 5 a 45 °C.....	55

Figura 19: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com extrato de calêndula pelo método MTT.....	57
Figura 20: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com hidrogel alginato-calêndula pelo método MTT.....	58
Figura 21: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com extrato de calêndula pelo método SRB.....	60
Figura 22: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com hidrogel alginato-calêndula pelo método SRB.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de flavonoides nos extratos glicólicos de calêndula expressos em quercetina.....	40
Tabela 2 – Viscosidade das formulações de alginato e CMC.....	44
Tabela 3 – Viscosidade das formulações com extratos glicólicos e calêndula.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
d	Diâmetro médio
DAD	Detector por arranjos de diodos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Extrato
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
Ei	Espalhabilidade da amostra
H	Hidrogel alginato-calêndula
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico, N- (2-hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanossulfônico)
IL-6	Interleucina-6
MEC	Matriz Extracelular
MEV-FEG	Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo
MTT	metiltetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)
Pa	Pascal
Pa.s	Pascal por segundo
PBS	Tampão fosfato (Phosphate buffered saline)
PD	Perda por Dessecação
PPG	Propilenoglicol
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforodamina B
TCA	Tricloroacético
TFT	Teor de Flavonóides Totais
TG	Termogravimetria
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UV/vis	Ultravioleta-visível
ρ	Densidade relativa;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 LESÕES CUTÂNEAS.....	15
3.2 A CICATRIZAÇÃO.....	15
3.3 APLICAÇÃO E TIPOS DE CURATIVOS.....	16
3.4 ALGINATO E HIDROGÉIS.....	17
3.5 CALÊNDULA.....	20
3.5.1 Botânica.....	20
3.5.2 Composição fitoquímica.....	21
3.5.3 Atividade farmacológica.....	23
3.5.4 Efeito cicatrizante e citotóxico.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	25
4.1.1 Obtenção do material vegetal.....	25
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	25
4.2.1 Perda por dessecação.....	25
4.2.2 Doseamento de flavonoides totais nas flores de calêndula.....	26
4.3 EXTRATOS DE <i>Calendula Officinalis</i> L.....	27
4.3.1 Preparo dos extratos.....	27
4.3.2 Caracterização qualitativa por espectrofotometria UV-visível.....	28
4.3.3 Doseamento de flavonoides nos extratos glicólicos.....	28
4.3.4 Fingerprint cromatográfico de extrato glicólico de calêndula.....	28
4.4 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	29
4.5 ANÁLISES DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS.....	29
4.5.1 Centrifugação.....	29
4.5.2 pH.....	30
4.5.3 Viscosidade.....	30
4.5.4 Espalhabilidade.....	30
4.6 ANÁLISE TÉRMICA DOS HIDROGÉIS.....	31
4.7 ANÁLISE REOLÓGICA DOS HIDROGÉIS.....	31
4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	31
4.8.1 Cultivo e linhagem celular.....	31

4.8.2 Ensaio de viabilidade celular pelo teste colorimétrico do metiltetrazólio (MTT)	32
4.8.3 Avaliação da viabilidade celular por coloração de proteínas (Sulforodamina B (SRB)	33
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 MATERIAL VEGETAL.....	35
5.1.1 Caracterização da espécie.....	35
5.1.2 Perda por Dessecação.....	36
5.1.3 Doseamento de flavonoides totais nas flores de calêndula.....	36
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DOS EXTRATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL.....	37
5.3 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS.....	39
5.4 <i>FINGERPRINT</i> CROMATOGRÁFICO.....	41
5.5 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	43
5.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO.....	45
5.6.1 Centrifugação.....	46
5.6.2 pH.....	46
5.6.3 Viscosidade.....	48
5.6.4 Espalhabilidade.....	49
5.7 ANÁLISE TÉRMICA DOS HIDROGÉIS.....	51
5.8 ANÁLISE REOLÓGICA.....	52
5.9 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	56
5.9.1 Avaliação da viabilidade celular pelo teste colorimétrico do metiltetrazólio (MTT)	56
5.9.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio da Sulforodamina B (SRB).....	59
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

As feridas crônicas são consideradas um problema de saúde pública com impactos sociais, econômicos e na qualidade de vida dos pacientes. A aplicação de curativos é imprescindível no tratamento de feridas crônicas; entretanto, apesar da ampla diversidade disponível, o custo de curativos bioativos geralmente é muito elevado, tornando-os pouco acessíveis aos pacientes (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; VASCONCELOS, 2018).

Atualmente, os curativos mais utilizados são fabricados com alginato, um polissacarídeo obtido de algas marinhas marrons (MAURSTAD *et al.*, 2008; SOUZA, 2019). Os curativos de alginato, nas formas de fibras dos sais de cálcio e sódio ou de hidrogéis, possuem propriedades hemostáticas, capacidade de absorver exsudato, manter úmido o leito da ferida, promover o desbridamento autolítico e, consequentemente, a cicatrização (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A incorporação de outros compostos em curativos de alginato pode auxiliar o efeito cicatrizante. A adição de carvão ativo serve para filtrar o odor desagradável, enquanto a prata age sobre o biofilme bacteriano de feridas infectadas. A incorporação de compostos naturais com ação antibiótica, anti-inflamatória e cicatrizante pode auxiliar a combater infecções e a regeneração celular (MOGOSANU & GRUMEZESCU, 2014; LIAKOS *et al.*, 2014).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que filmes de alginato com gel de babosa (*Aloe barbadensis* Mill.) favorecem a cicatrização ao induzir menor quantidade de infiltrado inflamatório, aumento da angiogênese durante a fase proliferativa e maior produção de fibras colágeno tipo I (KOGA *et al.*, 2018; KOGA *et al.*, 2020).

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade para acelerar a cicatrização de feridas. No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi implantada em 2006, visando a utilização de fitoterápicos no SUS. Entretanto, apesar da diversidade da flora brasileira e do incentivo ao cultivo e uso de plantas medicinais, apenas um medicamento fitoterápico, uma pomada com extrato de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), foi aprovado para o tratamento de lesões de pele (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014; DINDA *et al.*, 2015).

O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011) preconiza o uso de infusão, tintura, gel e creme de calêndula (*Calendula officinalis* L.) como anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante. As flores são ricas em flavonoides, responsáveis pela atividade anti-inflamatória, e triterpenos que favorecem a migração e proliferação celular (FRONZA *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

Apesar da indicação terapêutica em lesões cutâneas, não há curativos comerciais com extratos de calêndula. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar o efeito citotóxico de um hidrogel de alginato contendo extrato de calêndula.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um hidrogel de alginato contendo extrato de *Calendula officinalis* L. e avaliar o seu efeito citotóxico *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a melhor solução extratora para obtenção de extratos glicólicos de calêndula;

Avaliar o perfil fitoquímico de extratos glicólicos de calêndula por espectrofotometria e CLAE-DAD;

Obter e caracterizar as propriedades físico-químicas e a estabilidade do hidrogel de alginato-calêndula;

Avaliar o efeito do hidrogel sobre a viabilidade celular em culturas de fibroblastos 3T3.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LESÕES CUTÂNEAS

A pele é constituída por duas camadas: epiderme e derme. A epiderme, camada mais externa, é composta por um epitélio estratificado pavimentoso, melanócitos e queratinócitos (BREder, 2017; SOUZA, 2019). É a principal barreira física contra patógenos, irradiação e toxinas, e consequentemente aos fármacos utilizados por via tópica (ALVES, 2015).

A derme, camada subsequente à epiderme, é formada por fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental (ALBERTS, *et al.*, 2017), útil no processo de reparo de lesões (GONÇALVES, 1991).

Uma descontinuidade do tecido cutâneo, ocasionada por trauma físico, químico ou em decorrência de doenças como o diabetes, geram feridas ou lesões. As feridas são classificadas de acordo com diferentes parâmetros como, por exemplo, o tempo de reparação tecidual. Nas feridas agudas, o reparo ocorre de maneira natural em poucos dias, enquanto nas feridas crônicas não há completa restauração tecidual e funcional dentro de três meses (BLANES, 2004; BREder, 2017).

Outra classificação das feridas é baseada na gravidade com que atingem as camadas da pele. As lesões superficiais são aquelas em que apenas a epiderme é atingida. As feridas profundas parciais atingem o tecido subcutâneo e nas lesões profundas totais há destruição da epiderme, derme e tecido subcutâneo e podem atingir até músculos, ossos e tendões (BLANES, 2004; SOUZA, 2019).

3.2 A CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização é complexo e inicia imediatamente após uma injúria ao tecido cutâneo, abrangendo vários eventos celulares, moleculares e bioquímicos com o objetivo da restauração completa do órgão (VASCONCELOS, 2018).

Os principais eventos que ocorrem no processo de cicatrização podem ser divididos didaticamente em 3 fases: inflamatória, proliferativa ou granulação e remodelagem (MENDONÇA, *et al.*, 2009).

A primeira fase (fase inflamatória) é caracterizada pela hemostasia, realizada pelas plaquetas e fibrinogênio que segregam inúmeros mediadores inflamatórios quimiotáticos que através da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular promovem a migração de células para a ferida. A fase de proliferação é o momento em que a lesão é fechada, através dos seguintes eventos: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. A principal característica da fase de remodelamento é a tentativa da recuperação da estrutura normal, com a contração cicatricial, através da deposição ordenada de colágeno e a secreção de collagenase pelos fibroblastos e leucócitos que fazem a lise da matriz antiga (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENDONÇA, *et al.*, 2009; VASCONCELOS, 2018).

Os fibroblastos são células fusiformes alongadas que estão presentes no tecido conjuntivo e desempenham papel importante durante o processo de cicatrização. São as células que sintetizam as fibras colágenas, reticulares e elásticas e a substância fundamental que irá compor a matriz extracelular (MEC). A MEC, por sua vez, auxilia no controle da proliferação, diferenciação, migração e da função celular. Portanto, quando ocorre um ferimento, os fibroblastos são atraídos ao local e desempenham suas funções sobre a MEC auxiliando na cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ALBERTS, *et al.*, 2017).

A resolução de uma ferida só é considerada completa após a maturação da matriz extracelular que pode levar anos. Mesmo após a conclusão da cicatrização, a cicatriz possui apenas 70% da resistência da pele normal; portanto, o tecido lesado nunca é totalmente recuperado (NELIGAN; GURTNER, 2015).

3.3 APLICAÇÃO E TIPOS DE CURATIVOS

O principal problema das lesões cutâneas são as feridas crônicas, de cicatrização tardia e tratamento prolongado. O processo de cicatrização é variável e depende de fatores inerentes ao estado de saúde do paciente; portanto, a fase da cicatrização e a presença de infecção, são aspectos que devem ser levados em consideração na escolha de um curativo, assim como o seu custo-benefício (FRANCO; GONÇALVES, 2008; GYLES *et al.*, 2020).

Há evidências de que as feridas ocluídas com curativos têm a reepitelização mais rápida do que aquelas que ficam expostas ao ar (OLIVEIRA *et al.*, 2011;

BENTOS, 2018). No entanto, algumas características são importantes para um curativo, como absorver o exsudato de maneira a não ressecar a lesão, compatibilidade com tecidos biológicos e ausência de toxicidade (ZHANG; ZHAO, 2020).

Os materiais oclusivos como gaze, algodão e bandagens que não estimulam o processo de cicatrização são utilizados com medicamentos tópicos, como a pomada de sulfadiazina de prata e a colagenase que contribuem para evitar o ressecamento da ferida e a invasão microbiana (YUDANOVA; RESHETOV, 2006).

Os curativos de tecidos estão sendo substituídos por outros confeccionados com polímeros naturais. O alginato, extraído de algas marinhas, apresenta semelhança química e biológica com os tecidos do corpo humano, uma vez que este biopolímero ao entrar em contato com o exsudato adquirem consistência gelatinosa, tornando-se semelhante a matriz extracelular. Por isso, os biopolímeros são materiais úteis para confecção de curativos, mantendo o local úmido e propício à cicatrização (MULDER *et al.*, 1985; KIM *et al.*, 2008; BOATENG *et al.*, 2008).

Atualmente no mercado farmacêutico são encontrados diversos hidrogéis de alginato para o tratamento de lesões cutâneas como Dersani[®], Curatec[®], Algiderm[®], PhytaCare[®], Restore[®] e SeaSorb[®]. O alginato é o principal ativo encontrado nesses produtos, porém alguns possuem em sua composição outros compostos ativos. Dersani, por exemplo, contém vitamina A e E e ácidos graxos; em contrapartida Curatec é composto apenas por alginato de sódio e cálcio.

Os curativos especiais compostos de biomateriais geralmente possuem um custo elevado, o que limita o acesso ao paciente e torna o tratamento mais oneroso para o sistema de saúde.

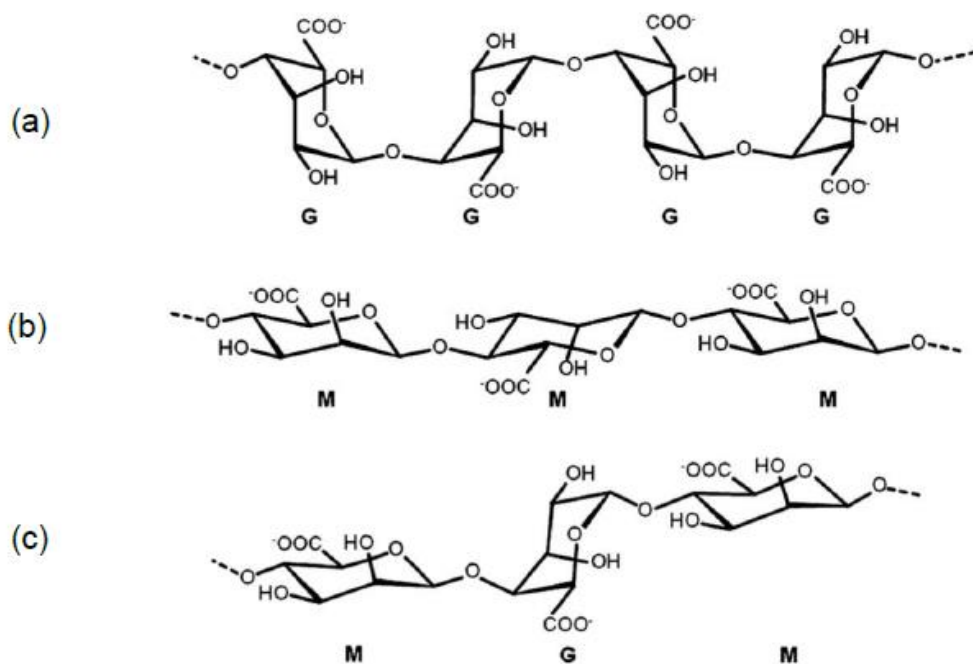
3.4 ALGINATO E HIDROGÉIS

O alginato é um polímero hidrofílico aniônico (BREDEK, 2017) obtido principalmente de algas marinhas marrons e também de bactérias *Azobacter vinelandii* e outras do gênero *Pseudomonas* (MAURSTAD *et al.*, 2008).

A estrutura química do alginato é formada por co-polímeros lineares organizados em blocos de ácido D-manurônico (bloco M) e ácido L-gulurônico (bloco G) (Figura 1). A principal diferença entre os blocos é resultante da conformação,

uma vez que G se dobra e M mantém-se como uma fita estendida (AMSDEN; TURNER, 1999; GEORGE; ABRAHAM, 2006; SILVA, 2013).

Figura 1: Estrutura química do alginato com os blocos de (a) ácido D-manurônico (bloco M), (b) ácido L-gulurônico (bloco G) e (c) junção dos blocos M e G no polímero.



Fonte: CRUZ *et al.*, 2008.

A estrutura linear e alta massa molar do alginato permite a obtenção de filmes no estado sólido que são capazes de formar hidrogéis com grande capacidade de retenção de água (SOUZA, 2019).

O alginato é biocompatível, atóxico e possui emprego em diversas áreas, como na indústria de alimentos e bebidas; na indústria farmacêutica no revestimento de cápsulas em sistemas de liberação prolongada de fármacos e na fabricação de curativos de feridas cutâneas (ERTESVÁG; VALLA, 1998; SILVA, 2013).

Devido às características hidrofílicas e à capacidade de absorver umidade, o alginato é utilizado na fabricação de curativos. Tem a capacidade de absorver o exsudato e favorece o desbridamento autolítico. A manutenção da umidade no leito da ferida proporciona um ambiente adequado à cicatrização, favorecendo uma rápida granulação e reepitelização da ferida (SOUZA, 2019; GYLES *et al.*, 2020; MILIAN, 2020).

Além de absorver o exsudato formando uma camada gelatinosa na superfície da lesão, os curativos de alginato aderem à ferida e permitem a remoção sem ocasionar lesões secundárias no tecido cicatricial. Porém, é importante que o hidrogel de alginato não desidrate completamente a ferida, pois quando fica completamente seco pode aderir ao leito da lesão e ocasionar danos no momento da remoção (ZHANG; ZHAO, 2020).

O alginato é capaz de ativar macrófagos e estimular monócitos a produzir interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) para acelerar a cicatrização de feridas crônicas (ABASALIZADEH *et al.*, 2020; ZHANG; ZHAO, 2020).

As células mononucleares são as primeiras a responder durante o processo de cicatrização, e os hidrogéis de alginato podem mimetizar o microambiente nativo das células, sendo utilizados como matrizes celulares sintéticas. No entanto, suas propriedades físico-químicas são dependentes do tipo de estrutura, peso molecular e composição do alginato. Por isso, os hidrogéis necessitam de reforço, como suportes fibrosos que podem ser obtidos através de reticulação física ou química. Para obtenção de hidrogéis resistentes e rígidos, pode ser feito o aumento da concentração do polímero, mas a reticulação é uma estratégia mais eficiente (NEVES *et al.*, 2020; ZHANG; ZHAO, 2020).

Os hidrogéis de alginato podem conter em sua composição carboximetilcelulose, glicerol e propilenoglicol (MORE *et al.*, 2007). São indicados para o tratamento de feridas secas ou com pouco exsudato, pois em feridas com muito exsudato o excesso de umidade pode acarretar em maceração tecidual ao redor da ferida (SACKHEIM *et al.*, 2006).

Estudos que avaliaram a aplicação de hidrogel de alginato de cálcio como curativo evidenciaram fácil espalhabilidade e remoção, sem adesão à lesão, evitando trauma ao tecido em formação e dor no momento da retirada. Além disso, o cálcio presente permite a hemostasia local e participa da cascata de coagulação (BREder, 2017; KOGA *et al.*, 2018).

3.5 CALÊNDULA

3.5.1 Botânica

Calendula officinalis (Figura 2), popularmente chamada de calêndula, mal-me-quer e marigold (nome em inglês), pertence à família Asteraceae. Originária dos países europeus, posteriormente foi cultivada comercialmente na América do Norte e atualmente é cultivada em toda a zona temperada do mundo para uso medicinal e ornamental (MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

Figura 2: Flores da espécie *Calendula officinalis*.



Fonte: Anvisa, 2014

É uma planta anual, raramente bianual, com 30 a 60 cm de altura, folhas espatuladas na base e oblongas e mucronadas acima. O caule é angular, felpudo e sólido e as flores são amarelo brilhante a laranja. A cabeça da flor é composta por epicálise de numerosas sépalas lanceoladas e corola oblonga, espatulada, tridentada no topo (MEHTA *et al.*, 2012; ARORA; RANI; SHARMA, 2013).

As flores apresentam odor característico e aromático. Seu sabor é levemente amargo (ARORA; RANI; SHARMA, 2013). Ao exame microscópico, apresenta células da epiderme interna e externa alongadas, retangulares, com paredes retas a ligeiramente sinuosas, cutícula estriada na flor radial. Na epiderme interna os estômatos são ausentes, enquanto estômatos anomocíticos ocorrem na epiderme exterior. Os tricomas glandulares unisseriados ou bisseriados são numerosos abaixo

do ponto de inserção dos estames. Os grãos de pólen são esféricos, com numerosas espinhas curtas (ARORA; RANI; SHARMA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

Os ligulados e as flores compostas de calêndula são os materiais de interesse terapêutico. A espécie *Tagetes erecta* L. é facilmente confundida com a *Calendula officinalis* L. por pertencerem à mesma família e também ser chamada em alguns países de “marigold”. Por isso, a identificação dos compostos bioativos através de técnicas como a espectrofotometria UV-visível e o *fingerprint* cromatográfico auxiliam na caracterização mais exata da droga vegetal, evitando equívocos e adulteração (MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

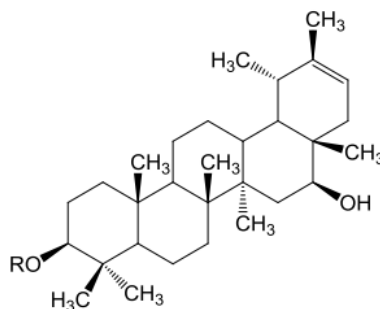
3.5.2 Composição fitoquímica

Os constituintes fitoquímicos da calêndula variam de acordo com o processo de extração e o solvente, porém os principais metabólitos secundários são as saponinas triterpênicas (ácido oleanólico), compostos fenólicos como os ácidos fenólicos e flavonoides (3-O-glicosídeos de isoramnetina e quercetina), incluindo astragalina, hiperosídeo, isoquercitrina e rutina. Outros constituintes são os óleos essenciais, ácidos graxos, sesquiterpenos e triterpenos (MEHTA *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

A análise de extrato das flores de calêndula por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou a presença de carotenóides (licopeno, luteína, β -caroteno, neoxantina, violaxantina e anteraxantina). Os carotenóides estão relacionados com a coloração amarelo-alaranjada das pétalas de calêndula. Ainda, observou-se que as flores alaranjadas apresentam mais bandas cromatográficas de carotenóides quando comparados com as flores amareladas, mais exatamente 19 e 9 carotenóides, respectivamente (KISHIMOTO *et al.*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

Os triterpenóides (Figura 3), principalmente os ésteres palmitato de faradiol, miristato de faradiol e laurato de faradiol, apresentam ação em inflamações da pele e mucosas e na cicatrização de feridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

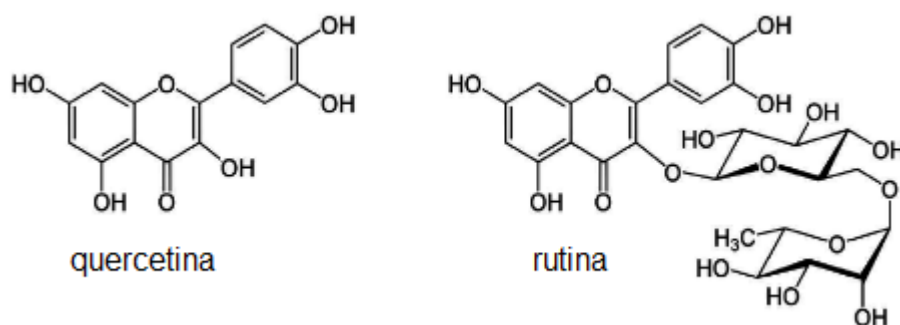
Figura 3: Estrutura dos monoésteres do faradiol, onde, R = lauril, miristil ou palmitil.



Fonte: Anvisa, 2014.

Os flavonoides da calêndula também são amplamente estudados devido suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiviral e moduladora do sistema imune. Os principais flavonoides são a quercetina e a rutina (Figura 4) (BEHLING, 2004).

Figura 4: Estrutura dos flavonoides quercetina e rutina.



Fonte: ARAÚJO, 2016.

O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) preconiza o uso de infusão aquosa, tintura, extrato fluido e extrato com óleo fixo das flores da calêndula no preparo das formulações dermatológicas. A descrição de extratos glicólicos, geralmente utilizados em formulações cosméticas, é limitada e indica a presença de flavonoides glicosilados e terpenoides, carotenoides polares, ácidos fenólicos, taninos, aminoácidos e polissacarídeos (ANDERSEN *et al.*, 2010).

Dentre os poucos extratos glicólicos descritos, encontra-se a composição do Phytexcell, um extrato obtido com glicerina, butilenoglicol e água patenteado pelo Grupo Croda, que possui isoramnetina-3-glicosídeo, ácido clorogênico, narcissina, rutina e quercetina (ANDERSEN *et al.*, 2010).

3.5.3 Atividade farmacológica

As aplicações farmacológicas da calêndula são descritas desde a idade média, cujas flores eram utilizadas para obstruções hepáticas e fortalecer o coração. No século XVIII, era utilizada como remédio para dor de cabeça, icterícia e vermelhidão nos olhos e, durante a guerra civil americana, no tratamento de feridas, sarampo, varíola e icterícia (ARORA; RANI; SHARMA, 2013).

Dentre as diversas espécies de calêndula, a *Calendula officinalis* L. é a única amplamente utilizada com finalidade terapêutica. É de uso popular e está descrita em monografias da Organização Mundial de Saúde para o tratamento de afecções de pele, inflamações, feridas e queimaduras. No Brasil, o uso como cicatrizante e anti-inflamatório está regulamentado pela RE nº 89 de 16 de março de 2004 da ANVISA (ARORA; RANI; SHARMA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

As preparações com calêndula são utilizadas para cortes superficiais, erupções cutâneas, inflamações de pele e mucosas, eritemas, gengivite e artrite. Outros usos descritos popularmente mas não fundamentados por estudos clínicos, incluem o tratamento da amenorreia, angina, gastrite, hipotensão, icterícia, reumatismo e vômitos. São ainda relatados usos como antiespasmódicos, diaforéticos, anti-hemorragico e emenagogo. Alguns estudos enfatizam a calêndula como antimicrobiano, antiviral e potencialmente efeitos antitumorais (MEHTA *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014).

O óleo essencial de calêndula é utilizado como calmante do sistema nervoso central, bem como a tintura-mãe da planta é empregada na homeopatia para tratamento da tensão mental e insônia, devido ao seu potencial sedativo (ARORA; RANI; SHARMA, 2013).

3.5.4 Efeito cicatrizante e citotóxico

Vários estudos *in vitro*, pré-clínicos *in vivo* e ensaios clínicos em humanos foram realizados com o intuito de avaliar o efeito da calêndula na cicatrização de feridas.

Através de estudos de citotoxicidade *in vitro* realizados por Okuma (2013) conclui-se que emulsões com gel à base de óleo de calêndula possuem baixa citotoxicidade. Fronza *et al.* (2009) sugeriram que a partir do estudo *in vitro* com

células de fibroblastos murinos 3T3 que monoésteres de triterpenos, miristato e palmitato de faradiol estimulam a migração e a proliferação celular e poderiam influenciar positivamente a cicatrização.

O extrato etanólico de calêndula foi avaliado por via tópica para tratamento de feridas agudas em animais (ratos ou camundongos). As soluções tópicas foram comparadas com a administrado solução salina (grupo placebo), água, base de gel creme, pomada de iodopovidona. Em todos os estudos, o extrato de calêndula foi associado a uma melhor cicatrização, aumento da angiogênese e colágeno mais denso no tecido de granulação. Observou-se ainda a diminuição de células inflamatórias como macrófagos, plasmócitos e linfócitos. As avaliações macroscópicas demonstraram a redução da área de superfície da ferida (PREETHI *et al.*, 2009; PARENTE *et al.*, 2011; PARENTE *et al.*, 2012; SHAFEIE *et al.*, 2015; DINDA *et al.*, 2016).

A aplicação tópica de extrato hidroglicólico e etanólico de calêndula foi avaliada por Buzzi *et al.* (2016) e Duran *et al.* (2005), respectivamente, em úlceras crônicas causadas por insuficiência venosa. Os grupos controles receberam antibióticos tópicos e solução salina. Os autores do primeiro estudo observaram melhor epitelização e redução do tamanho da ferida em um menor período de tempo. Enquanto Duran *et al.* (2005) relataram redução significativa do tamanho da ferida com o tratamento com calêndula comparado ao controle, demonstrando os benefícios do tratamento com extrato de calêndula em pacientes com úlceras crônicas.

Os estudos dos efeitos da calêndula em ensaios animais fornecem evidências da melhora da fase inflamatória e aumento do tecido de granulação, atribuídos às propriedades anti-inflamatórias e também pela ativação da migração de fibroblastos, conforme observado em estudos *in vitro* (GIVOL *et al.*, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Obtenção do material vegetal

O material botânico (flores secas de *Calendula officinalis* L.) foi adquirido no comércio local, em embalagens de 30 g, da marca Chamel Produtos Naturais.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi caracterizado conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019). As pétalas foram separadas dos capítulos florais, cortadas e imersas em solução de hipoclorito de sódio (2%) para diafanização. Na sequência, os fragmentos foram corados com safranina (10 mg/mL) em etanol 95% diluídos em água destilada na proporção 1:1. As lâminas com os cortes histológicos foram analisadas para a identificação de estruturas anatômicas utilizando microscópio óptico Olympus CX 31, acoplado a câmera Olympus modelo C-7070. As fotos foram registradas com aumento de 400 x.

As faces abaxial e adaxial das pétalas foram avaliadas por um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG), marca Tescan, modelo Vega 3. A análise foi do tipo EDS (Energy Dispersive Spectroscopy), sob tensão de 15 kV e corrente de 102 mA.

4.2.1 Perda por dessecação

As flores secas de calêndula foram trituradas em liquidificador até um pó fino, conforme recomendado na monografia da espécie *Calendula officinalis* L. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O frasco pesa-filtro foi previamente limpo com álcool 70% e seco em estufa a 105 °C por aproximadamente 15 a 20 minutos, e pesado após resfriar em temperatura ambiente. Em seguida, foram pesados 2 g da amostra e transferidos para o pesa-filtro que foi colocado para secagem a 105 °C, até peso constante. As amostras foram transferidas para um dessecador e, após

resfriamento, novamente pesadas. A porcentagem de perda por dessecação (PD) foi calculada pela equação:

$$PD = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Onde:

PD = perda por dessecação

Pa = peso da amostra

Pu = peso antes da dessecação

Ps = peso após a dessecação

4.2.2 Doseamento de flavonoides totais nas flores de calêndula

O doseamento foi realizado pelo método colorimétrico por complexação com cloreto de alumínio, descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019) utilizando um espectrofotômetro Genesys 10S.

Os procedimentos de preparo das soluções (estoque, amostra e branco) foram realizados conforme recomendado na monografia da calêndula. A solução estoque foi obtida com o tratamento de 0,4 g da droga pulverizada e transferida para balão de fundo redondo de 100 mL. Acrescentou-se 1 mL de solução aquosa de metenamina 0,5% (m/v), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. A mistura foi colocada em aquecimento sob refluxo por 30 minutos. A solução foi resfriada e filtrada através de algodão para um balão volumétrico de 100 mL. Ao resíduo da droga e o algodão utilizado na filtração foram acrescidos com 20 mL de acetona e levados novamente ao banho-maria sob refluxo por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez.

Os filtrados foram reunidos em um único balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com acetona. Em funil de separação foram adicionados 20 mL dessa solução, 20 mL de água e 15 mL de acetato de etila. A extração foi repetida outras 2 vezes com 10 mL de acetato de etila. A fase de acetato de etila foi reservada em cada passo para retornar ao funil, ao qual foi adicionado 50 mL de água para lavá-la por duas vezes. Em seguida a fase de acetato de etila foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, completada com acetato de etila e homogeneizada.

A solução amostra foi preparada com 10 mL da solução estoque, 1 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (m/v) e completado volume para 25 mL com solução de ácido acético glacial a 5% (v/v) em álcool metílico.

A solução branco foi preparada em balão volumétrico de 25 mL com 10 mL de solução estoque e volume correspondente para completar o balão de ácido acético glacial 5% em álcool metílico.

Após 30 minutos, as absorbâncias foram lidas em 425 nm, utilizando-se a solução branco para zerar o equipamento. Os resultados foram expressos em percentual de flavonoides totais, calculados como hiperosídeo ($C_{21}H_{20}O_{12}$), de acordo com a fórmula:

$$TFT = \frac{A \times 625}{m \times 500}$$

Onde:

TFT = teor de flavonoides totais expressos em hiperosídeo %

A = absorbância medida para solução amostra

625 = fator de diluição

m = massa em g da planta, considerando a Perda por Dessecação (PD)

500 = coeficiente de absorção específica do hiperosídeo

4.3 EXTRATOS DE *Calendula Officinalis* L.

4.3.1 Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados por maceração utilizando de pétalas secas inteiras e trituradas (200-500 micras) com glicerina, propilenoglicol ou misturas desses solventes com água (10-50% (v/v)). As pétalas das flores de calêndula foram mantidas em contato com o solvente extrator por 14 dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, foi realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos armazenados em frasco âmbar.

4.3.2 Caracterização qualitativa por espectrofotometria UV-visível

Alíquotas dos extratos glicólicos foram coletadas após 14 dias de maceração e diluídas (1:1000) em água deionizada para analisadas por espectrofotometria de varredura na faixa de 200 a 500 nm, utilizando um espectrofotômetro Genesys 10S.

4.3.3 Doseamento de flavonoides nos extratos glicólicos

O doseamento foi realizado pelo método espectrofotométrico por complexação com cloreto de alumínio descrito por Bortolo, Marques e Pacheco (2009), com algumas alterações. O ensaio foi realizado em triplicata para cada um dos extratos com 1 mL de extrato, 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (m/v) e o volume completo para 10 mL em balão volumétrico com ácido acético 5% (v/v) em álcool metílico.

A solução branco foi preparada para cada extrato com 1 mL de extrato e volume completo para 10 mL com a solução metanólica de ácido acético. Aguardou-se 30 minutos com as soluções protegidas da luz antes das leituras das absorbâncias em 425 nm. O teor de flavonoides foi obtido pela equação de regressão de uma curva de calibração obtida com quercetina na faixa de concentração de 2,5 a 20 mg/mL.

4.3.4 *Fingerprint* cromatográfico de extrato glicólico de calêndula

No método CLAE-DAD, os extratos foram diluídos com água deionizada (1:10) e as soluções obtidas foram filtradas através de membranas de nylon de 0,45 µm. Alíquotas de 10 µL das soluções foram injetadas no sistema cromatográfico Nexera-i MT Shimadzu, equipado com uma coluna Synergi™ Polar-RP 4 µm, 80 Å, 250 x 4,6 mm. As fases móveis (água (A) e metanol (B) acidificados com 0,01% de ácido fórmico), foram utilizadas em modo gradiente (0-3 min, 30-50 % B; 3-19 min, 50-50 %B; 19-20 min, 30-30%B) com fluxo de 0,8 mL/min. Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-800 nm. Foram registrados cromatogramas em comprimentos de onda de 255 nm e 355 nm.

4.4 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Na fase de desenvolvimento do produto, avaliou-se a influência dos componentes da formulação sobre a viscosidade do produto. Foram avaliadas as concentrações da solução de alginato de sódio, a proporção de extrato de calêndula e a proporção de carboximetilcelulose (CMC).

Foram utilizadas soluções de alginato 1 a 3%, extrato glicólico de calêndula (2,5 a 20%) e CMC (1,0 a 2%). A imidazolidinilureia (0,2%) e o benzoato de sódio (0,1%) foram utilizados como conservantes das formulações. A viscosidade da formulação de alginato com adição de CMC, bem como a viscosidade da formulação com extrato de calêndula em propilenoglicol e glicerina foram avaliadas em viscosímetro Brookfield, spindle 4 a 6 rpm.

4.5 ANÁLISES DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

Os estudos de estabilidade foram realizados conforme preconizado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004). O produto foi avaliado visualmente quanto as propriedades organolépticas, e analisados pH, viscosidade, espalhabilidade e densidade relativa nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias. As amostras foram envasadas em bisnagas de alumínio e permaneceram sob diferentes condições de temperatura de armazenamento, sendo: 4 ± 1 °C (refrigerador), temperatura ambiente (19,5 °C, temperatura média ambiente durante o período de realização do estudo na cidade de Ponta Grossa/PR (valores de Weather Spark) e 40 ± 2 °C (estufa).

4.5.1 Centrifugação

O ensaio de centrifugação foi realizado durante o desenvolvimento da formulação. Foram utilizados 10 g de amostra em tubos Falcon e centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos. Em seguida, observou-se eventual separação de fases como indicativo de estabilidade.

4.5.2 pH

O pH do hidrogel foi medido pelo método potenciométrico utilizando um pHmetro digital Digimed DMPH-2 com um eletrodo de vidro combinado Ag-AgCl, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em triplicata com amostras diluídas a 10 % (m/v) com água destilada.

4.5.3 Viscosidade

A viscosidade foi avaliada com as amostras armazenadas nas diferentes condições de temperatura e tempos estabelecidos, conforme descrito anteriormente. As amostras foram analisadas após atingirem a temperatura ambiente imediatamente antes do ensaio utilizando um viscosímetro de Brookfield, Quimis Q860M21, com *spindle* número 4, rotação de 6 rpm. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos em Pascal-segundo (Pa.s).

4.5.4 Espalhabilidade

A espalhabilidade do hidrogel foi avaliada de acordo com o método descrito por Knorst (1991), com adaptações. As análises foram realizadas utilizando lâminas de vidro colocadas sobre a amostra posicionada sobre um papel milimetrado. O papel milimetrado foi tracejado marcando as linhas laterais da lâmina de vidro e duas linhas diagonais, cruzadas no ponto central da lâmina. Cerca de 50 mg de amostra foi colocadas na lâmina de vidro na área de interseção das diagonais do papel milimetrado. Em seguida, outra lâmina de vidro com peso previamente definido foi suavemente posicionada sobre a primeira lâmina com a amostra. Decorridos 1 minuto, anotou-se o diâmetro do círculo formado pelo espalhamento da amostra. O mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes, com intervalos de 1 minuto, determinando-se o diâmetro médio.

O ensaio foi realizado em triplicata e a espalhabilidade calculada em função do peso aplicado, conforme a equação:

$$Ei = \frac{(d^2 \times \pi)}{4}$$

Onde,

E_i = espalhabilidade da amostra para peso i em mm^2 ;

d = diâmetro médio (mm).

4.6 ANÁLISE TÉRMICA DOS HIDROGÉIS

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em equipamento STA 409 EP (NETZSCH), em atmosfera inerte com gás nitrogênio (N_2) para purgar o sistema em uma vazão de 100 mL/min. A taxa de aquecimento foi de 10 °C/min com variação de 20 a 600 °C. Foram realizadas as análises termogravimétricas com 107,9 mg da amostra de hidrogel controle (sem adição de extrato), 144,9 mg de hidrogel com extrato de calêndula e 51,7 mg de óxido de alumínio (Al_2O_3) como material referência termicamente inerte para avaliar a estabilidade térmica da formulação.

4.7 ANÁLISE REOLÓGICA DOS HIDROGÉIS

As análises oscilatórias das formulações foram feitas utilizando um reômetro DRH-2 (TA Instruments). A geometria selecionada foi a cone-placa com as configurações de 40 mm de diâmetro, ângulo de inclinação do cone de 2° e gap de 1000 μm . Os procedimentos foram conduzidos com o software TRIOS®. A variação de temperatura foi avaliada na faixa de 5 a 45°C com aquecimento de 10 °C/min, conduzidos a uma taxa de stress-tensão constante de 1 % e varredura de frequência de 0,1 a 100 Hz. Foram registrados os valores do módulo elástico ou de armazenamento (G' em Pa), viscoso ou de perda (G'' em Pa) e viscosidade dinâmica (η' em Pa.s).

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

4.8.1 Cultivo e linhagem celular

Foram utilizadas células de fibroblasto murino (linhagem 3T3). As culturas celulares foram mantidas por expansão contínua em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*- Gibco) low glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de antibiótico (100 $\mu\text{L/mL}$ de penicilina; 100 $\mu\text{g/L}$ de

estreptomicina); contendo 2,5 g/L do agente tamponante HEPES e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). As células foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C, com 5% de CO_2 , sendo realizados repiques 3 vezes por semana.

4.8.2 Ensaio de viabilidade celular pelo teste colorimétrico do metiltetrazólio (MTT)

Em placas de 96 poços (KASVI), foram semeadas 1×10^4 células/poço que foram mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida o meio de cultivo dos poços foi cuidadosamente retirado e substituído pela diluição dos tratamentos extrato glicólico de calêndula (propilenoglicol- H_2O (9:1)) e hidrogel alginato-calêndula no meio de cultura DMEM *low* glucose, suplementado com 10% de SFB, acrescido de antibiótico (100 $\mu\text{L/mL}$ de penicilina; 100 $\mu\text{g/L}$ de estreptomicina); contendo 2,5 g/L do agente tamponante HEPES e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio em diferentes diluições (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640). Os tratamentos foram mantidos por um período de 24 e 48 horas, mantendo-se 4 poços com o meio de cultivo sem tratamento como controle celular e para retirar a interferência de absorbância do próprio composto. A solução de tratamento com a maior concentração foi adicionada aos poços que não possuíam células, sendo denominada como branco.

Decorridos os tempos de tratamento, as células foram avaliadas com uso de microscópio invertido para análise da morfologia celular. Em seguida, os meios dos poços foram cuidadosamente retirados e descartados, sendo substituídos por 50 μL de MTT (0,5 mg/mL diluído em PBS). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 2 horas e os cristais de formazan (precipitados de cor arroxeada formados por células viáveis), resultantes da reação de MTT, foram solubilizados com 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO).

As leituras das absorbâncias em 570 nm foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis de microplacas (Biotek Elx 800). Para a realização da análise estatística foram realizados dois experimentos independentes com quatro replicatas por experimento, dos quais foram obtidas as médias e determinada a viabilidade celular. Os valores de absorbância foram convertidos em percentual (%) de viabilidade celular através da equação:

$$\% \text{ Viabilidade} = \left(\frac{\text{Abs } t - \text{Abs } b}{\text{Abs } \Delta \text{ cn} - \text{Abs } b} \right) \times 100$$

Sendo que: Abs t = absorbância do poço com amostra;

Abs b = absorbância do branco;

Abs Δ cn= absorbância média controle negativo.

4.8.3 Avaliação da viabilidade celular por coloração de proteínas (Sulforodamina B (SRB))

As células foram semeadas em placas de 96 poços a 1×10^4 células/poço. Após 24h do plaqueamento, o meio de cada poço foi removido e substituído por diferentes diluições (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) do extrato glicólico de calêndula propilenoglicol- H_2O (9:1) e hidrogel alginato-calêndula em meio de cultivo DMEM *low* glucose, suplementado com 10% de SFB, acrescido de antibiótico (100 μ L/mL de penicilina; 100 μ g/L de estreptomicina); contendo 2,5 g/L do agente tamponante HEPES e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio.

Após o período de tratamento (24 e 48h) as placas de 96 poços foram vertidas, para remover seu conteúdo e lavadas uma vez com PBS. Foram adicionados 100 μ L de ácido tricloroacético 10% (TCA) gelado para fixar as células, e a placa foi mantida por 30 minutos em refrigerador. Em seguida, removeu-se o conteúdo da placa e esta foi lavada com 200 μ L de água destilada por cinco vezes.

A placa foi então mantida em local seco, virada para baixo, em temperatura ambiente por 24 horas. Na sequência, foram adicionados 40 μ L da solução de SRB 0,2% (0,02 g em 10 mL de ácido acético 1%) em cada poço da placa e esta foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos.

O corante SRB foi removido e cada poço foi lavado por cinco vezes com 200 μ L de ácido acético 1%. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado 100 μ L de TrisBase 10 mM e homogeneizados, adquirindo coloração rosa. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis a 432 nm e 620 nm (excitação e emissão, respectivamente). Os valores das absorbâncias obtidos foram subtraídos (432 nm - 620 nm) e expressos em viabilidade celular de acordo com a equação apresentada no item 4.7.2.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nas análises de estabilidade foram tabulados e os gráficos plotados através dos cálculos de média e desvio padrão no Excel. Os resultados obtidos dos ensaios *in vitro* foram analisados pelo programa GraphPad Prism (versão 7.00) e expressos como média $\pm$ desvio padrão, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação entre grupos, seguido do pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

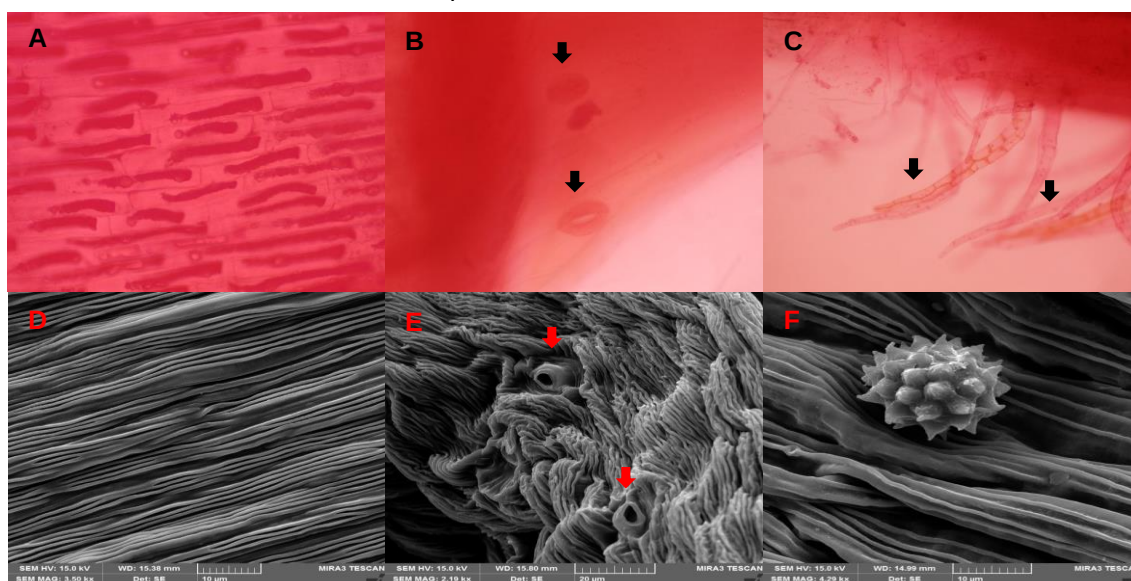
5.1 MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Caracterização da espécie

Os cortes histológicos das pétalas da calêndula foram observados em microscopia óptica e em microscopia eletrônica (MEV) (Figura 5) através das quais foi possível identificar as estruturas microscópicas características da espécie.

A face adaxial apresenta células da epiderme alongadas, retangulares, com paredes retas a levemente sinuosas e ausência de estômatos. Na face abaxial foram observadas células semelhantes a da face adaxial, a presença de estômatos anomocíticos, tricomas glandulares multicelulares, com cabeça ovalada e bisseriada e na antera observou-se grãos de pólen esféricos com espinhas curtas.

Figura 5: Imagens de microscopia óptica (400x) e microscopia eletrônica de cortes histológicos de pétalas de calêndula.



Fonte: A autora. Microscopia óptica: (A) células da epiderme da face adaxial. (B) estômatos da face abaxial. (C) tricomas glandulares. MEV: (D) células da epiderme da face adaxial. (E) estômatos da face abaxial. (F) pólen da face abaxial.

As estruturas encontradas nas pétalas das flores analisadas por microscopia óptica e eletrônica confirmaram os marcadores botânicos descritos na monografia da espécie *Calendula officinalis* L. (BRASIL, 2014) e Farmacopeia Brasileira 6ª edição (ANVISA, 2019).

De acordo com as monografias, as flores da calêndula são as partes de interesse farmacológico. A verificação da autenticidade do material vegetal, através dos marcadores microscópicos é de suma importância para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, uma vez que existem algumas espécies vegetais com flores compostas similares que podem ser utilizadas como adulterante da droga vegetal comercializada como calêndula (SOUZA *et al.*, 2010).

5.1.2 Perda por dessecação

O método gravimétrico em estufa tem a finalidade de determinar a quantidade de água e substâncias voláteis presentes na matéria-prima vegetal. O valor obtido consiste na diferença de massa antes e após a secagem do material vegetal em estufa a 105 °C.

A análise faz parte do controle de qualidade de matérias-primas vegetais, uma vez que o excesso de água possibilita a ação de enzimas e favorece o desenvolvimento de fungos e bactérias (BORGES *et al.*, 2005). A perda por dessecação obtida no ensaio com a calêndula foi de 9,35%. O valor máximo descrito na Monografia da espécie *Calendula officinalis* L. (BRASIL, 2014) é de 10%. Portanto, o valor obtido está dentro dos valores preconizados.

5.1.3 Doseamento de flavonoides totais nas flores de calêndula

O teor de flavonoides totais no ensaio com as flores secas e trituradas de calêndula foi de 0,76%, expressos em hiperosídeo ($C_{21}H_{20}O_{12}$). A monografia da Farmacopeia Brasileira descreve que as flores não devem conter menos que 0,40% de flavonoides totais. Portanto, o valor obtido está em conformidade com o preconizado.

Os flavonoides são produtos do metabolismo vegetal que desempenham diversas funções como regulação do desenvolvimento da planta, pigmentação e proteção contra radiação ultravioleta e, ainda, na defesa e sinalização entre plantas e microrganismos (MATHESIUS, 2018).

Na calêndula, os flavonoides são utilizados como marcadores de referência da atividade farmacológica. Os fatores como cultivo, colheita, secagem e armazenamento podem interferir na dosagem dessa classe de compostos ativos.

Assim, devido à importância farmacológica, é imprescindível conhecer o teor de flavonoides para garantir a qualidade do material vegetal (GOMES *et al.*, 2018).

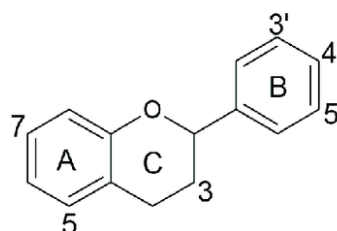
As condições ideais de cultivo comercial de calêndula sugerem que o manejo deve ser com irrigação regular e monitoramento do desenvolvimento foliar e do espessamento do caule. Além disso, o tempo para a colheita influencia a produtividade, a qualidade e, conseqüentemente, o teor de flavonoides nos capítulos florais (HONÓRIO *et al.*, 2016).

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DOS EXTRATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

Em geral, extratos de plantas medicinais podem ser preparados por infusão, percolação e maceração com diferentes solventes. O etanol e o metanol são os mais usados para a extração de polifenóis de matérias-primas vegetais (STALIKAS, 2007). Os extratos glicólicos são preparados com glicerol ou propilenoglicol e são comumente usados em formulações cosméticas. As composições destes extratos bem como as propriedades farmacológicas são escassas na literatura.

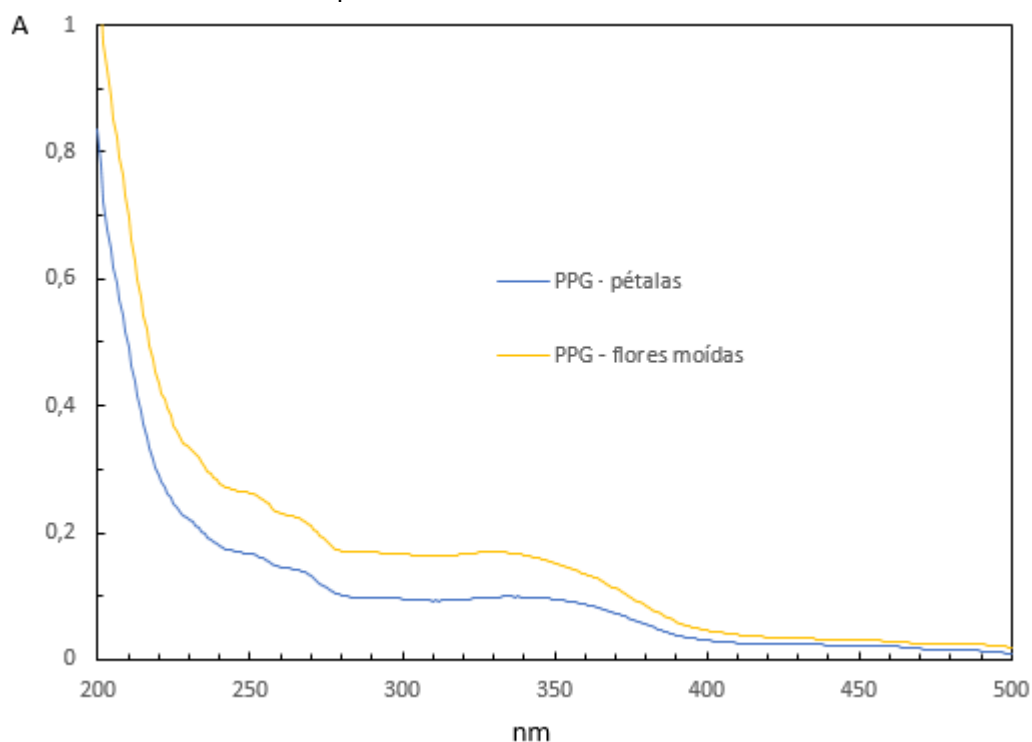
A glicerina e o propilenoglicol foram utilizados como solventes na obtenção de extratos glicólicos de calêndula por maceração da droga vegetal. A espectrofotometria UV-Vis foi utilizada para avaliação da eficiência da extração a partir da comparação da intensidade das bandas de absorção entre os veículos extratores. Os espectros UV-vis na faixa de comprimento de onda de 200-500 nm dos extratos glicólicos mostraram duas bandas de absorção características de compostos fenólicos, sendo mais intensas com o extrato preparado com propilenoglicol.

Compostos fenólicos apresentam duas bandas intensas no espectro UV-vis. A primeira banda com a absorção máxima na faixa espectral entre 250-285 nm e a segunda com o máximo na faixa de 320–390 nm. As bandas de absorção nessas faixas espectrais indicam a presença de compostos fenólicos e seus derivados. As duas bandas são características de flavonoides (Figura 6): a banda I é atribuída ao anel B, na faixa de 300 a 550 nm, e a banda II, na faixa de 240 a 285 nm, originada pelo anel A (BOHM, 1998). A intensidade da absorção está relacionada com a concentração dos compostos extraídos.

Figura 6- Sistema de anel de flavonoides

Fonte: Covington, 2009.

A recomendação para o preparo de tinturas e extratos de calêndula é com as flores duplas inteiras ou rasuradas, completamente abertas e destacadas do receptáculo (BRASIL, 2011). Os extratos glicólico obtido com o pó tamizado das pétalas das flores (250-500 microns) mostrou maior intensidade de absorção UV-Vis (Figura 7) quando comparado com o extrato obtido com as pétalas inteiras, evidenciando que o tamanho de partícula influencia a eficiência de extração dos compostos ativos.

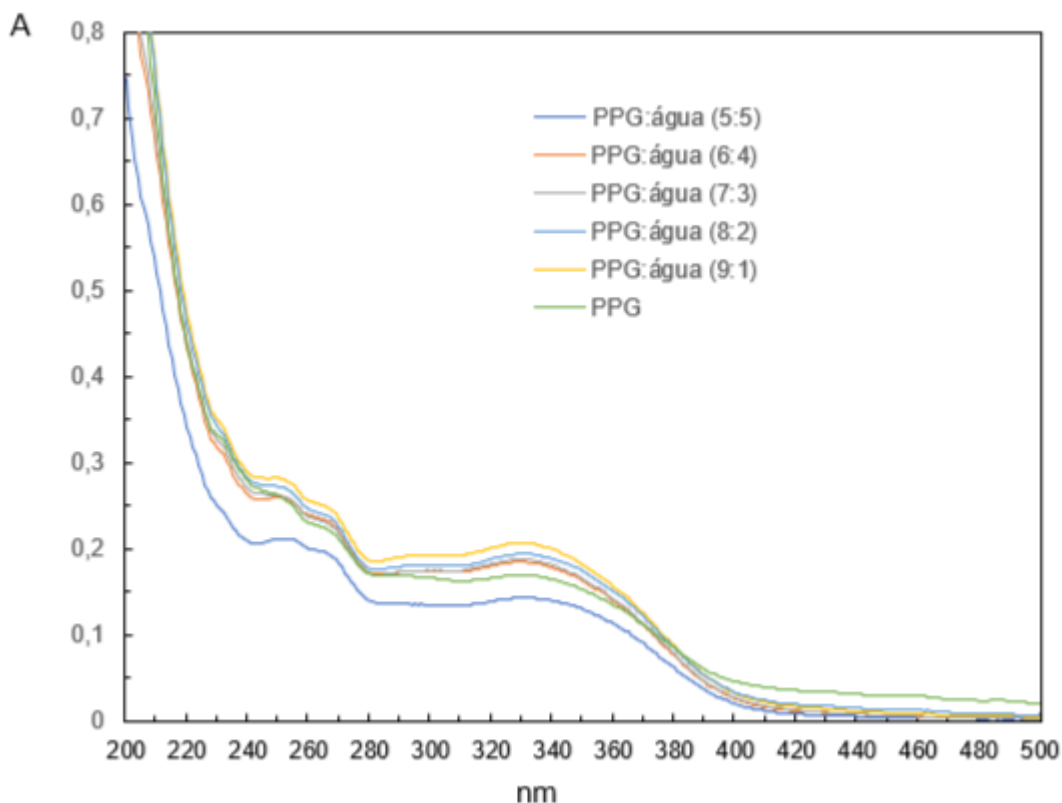
Figura 7: Espectros UV- visível de extratos glicólicos de propilenoglicol com diferentes tamanhos de partículas das flores de calêndula

Fonte: A autora.

A influência da proporção de água na mistura com o solvente extrator foi avaliada na faixa de 10 a 50% (v/v), utilizando-se 2% (m/v) do pó das flores de

calêndula. Os percentuais de 10 a 30% resultaram em intensidades de absorção superiores ao propilenoglicol (Figura 8), indicando que a adição de água aumenta a extração de compostos mais polares.

Figura 8: Espectros UV- visível de extratos glicólicos de calêndula com diferentes soluções extratoras.



Fonte: A autora.

Entretanto, observou-se que o aumento da quantidade de água acima de 30% reduziu a eficiência de extração dos compostos que absorvem na faixa de 200-500 nm.

5.3 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS

O teor de flavonoides nos extratos das flores de calêndula foi expresso em quercetina, utilizada como padrão na curva de calibração (Figura 9). O valor foi obtido utilizando as leituras das absorbâncias em triplicata (Tabela 1), calculado através da equação da reta:

$$A = 0,0779 x + 0,0012 \quad (r^2 = 0,9992)$$

Onde,

A = absorbância em 425 nm

x = concentração

Figura 9: Curva de calibração de quercetina.

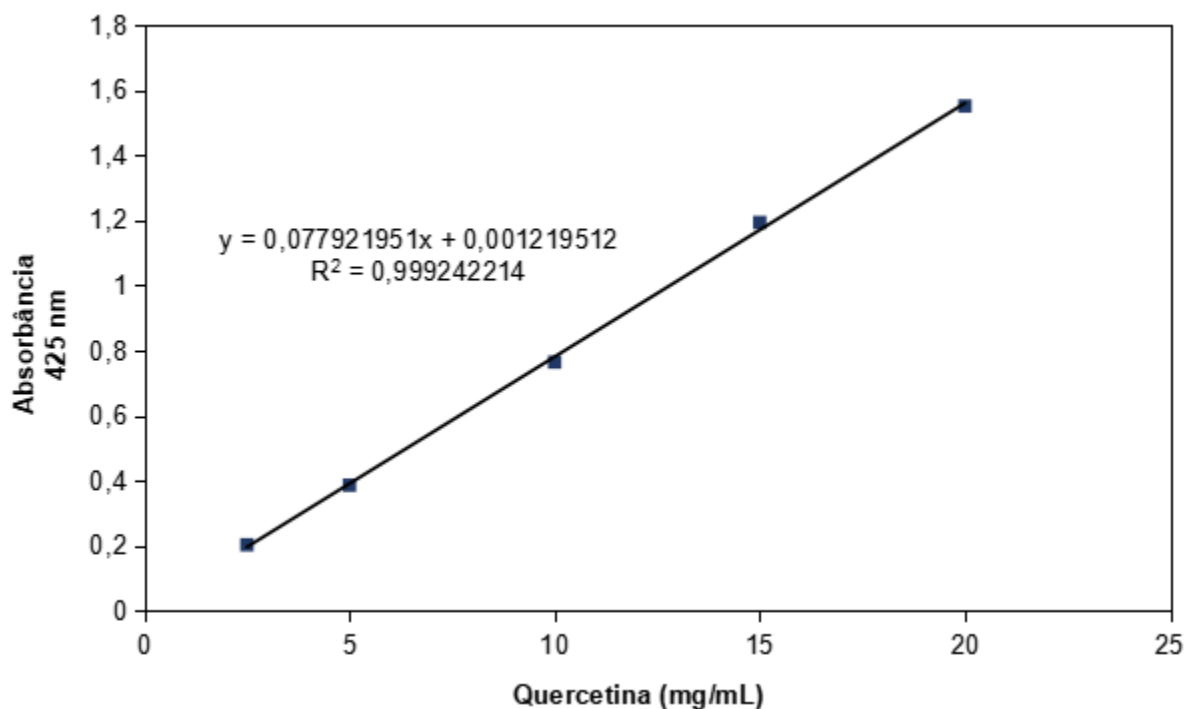


Tabela 1 – Teor de flavonoides nos extratos glicólicos de calêndula expressos em quercetina

Solvente extrator	Flor calêndula (%)	Absorbância $\pm s$	Teor (%) $\pm s$
glicerina	7,5	0,634 $\pm$ 0,028	0,081 $\pm$ 0,004
propilenoglicol	7,5	0,767 $\pm$ 0,001	0,098 $\pm$ 0
propilenoglicol	10	1,059 $\pm$ 0,103	0,136 $\pm$ 0,013

Fonte: A autora

As matérias-primas vegetais possuem teor de flavonoides geralmente entre 0,05% a 0,1%, sendo considerada de boa qualidade aquelas que apresentam valor superior a 0,1% (PACHECO, 2007). Assim sendo, todos os extratos produzidos apresentaram teor de flavonoides condizentes com os valores descritos na literatura. No entanto, os extratos com propilenoglicol foram os que apresentaram maior teor de flavonoides e por isso foram avaliados nos estudos subsequentes.

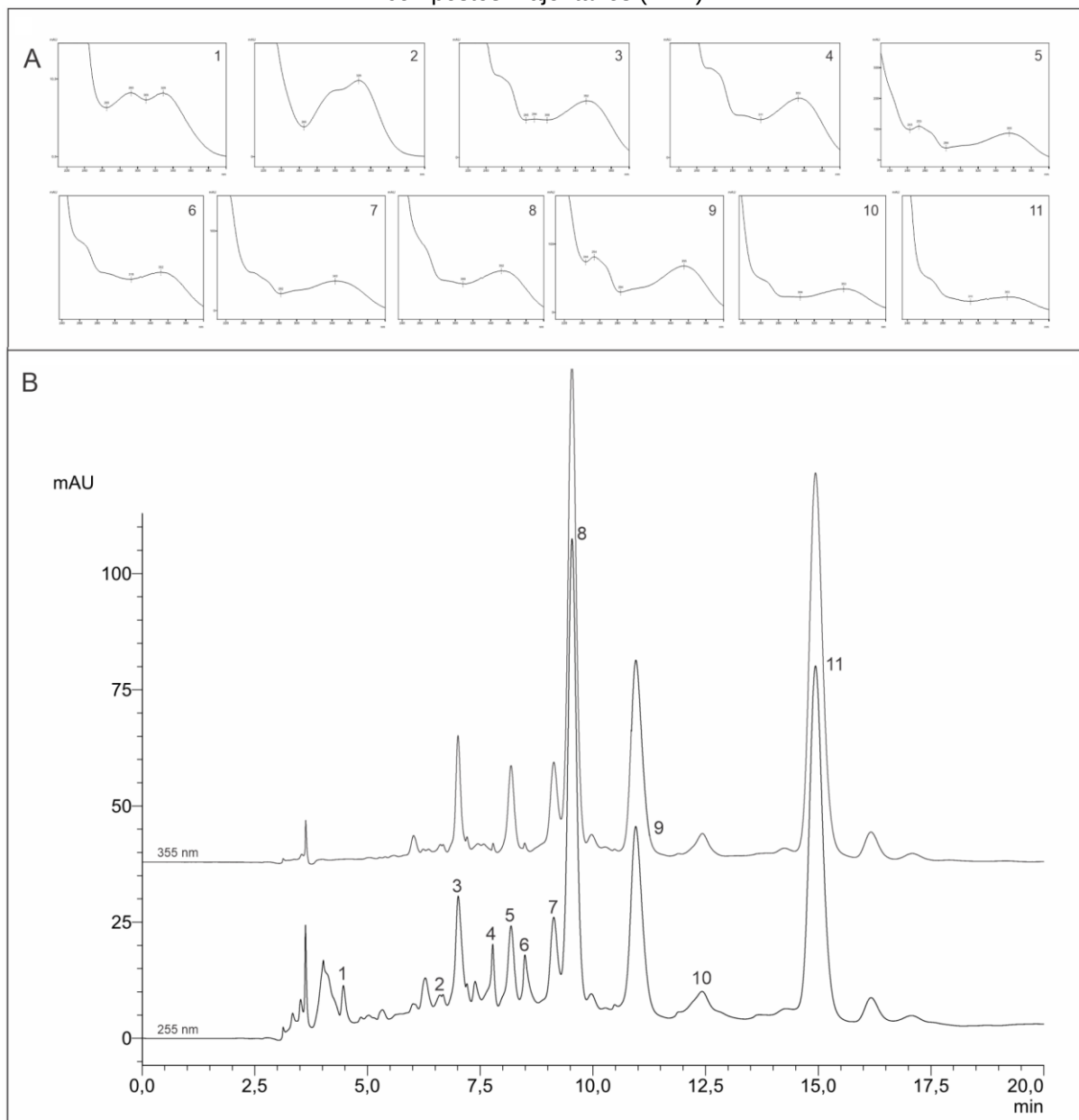
5.4 FINGERPRINT CROMATOGRÁFICO

A análise por CLAE-DAD do extrato glicólico foi realizada para obter o perfil *fingerprint* que permite identificar qualitativamente as classes de compostos bioativos extraídos das flores de calêndula. Na etapa de otimização da separação das bandas cromatográficas, metanol e acetonitrila e misturas com água foram avaliados como fases móveis. A fase móvel composta de metanol:H₂O com 0,01% ácido fórmico em modo gradiente apresentou resolução satisfatória na separação de pelo menos 11 compostos fenólicos e flavonoides.

A escolha do modo de detecção em CLAE é crucial para garantir que todos os compostos sejam detectados. O detector com arranjo de diodos (DAD) possibilita monitorar vários comprimentos de onda simultaneamente e todos os componentes que absorvem na região do UV-vis que estão presentes em quantidade acima do limite de detecção são detectados.

O *fingerprint* cromatográfico do extrato glicólico 10% (m/v) (propilenoglicol:H₂O, 9:1) registrado em 255 e 355 nm os espectros UV-DAD estão apresentados na Figura 10. Os espectros UV-DAD dos compostos 3-11 mostraram bandas com λ_{max} em 352-355 nm (banda I) e 254 nm (banda II), características de flavonoides. Os compostos 1-2, mais polares, apresentaram a banda I com λ_{max} em 325-330 nm, característica de ácidos fenólicos.

Figura 10: *Fingerprint* CLAE-DAD típico de extrato glicólico de flores de calêndula e espectros dos compostos majoritários (1-11).



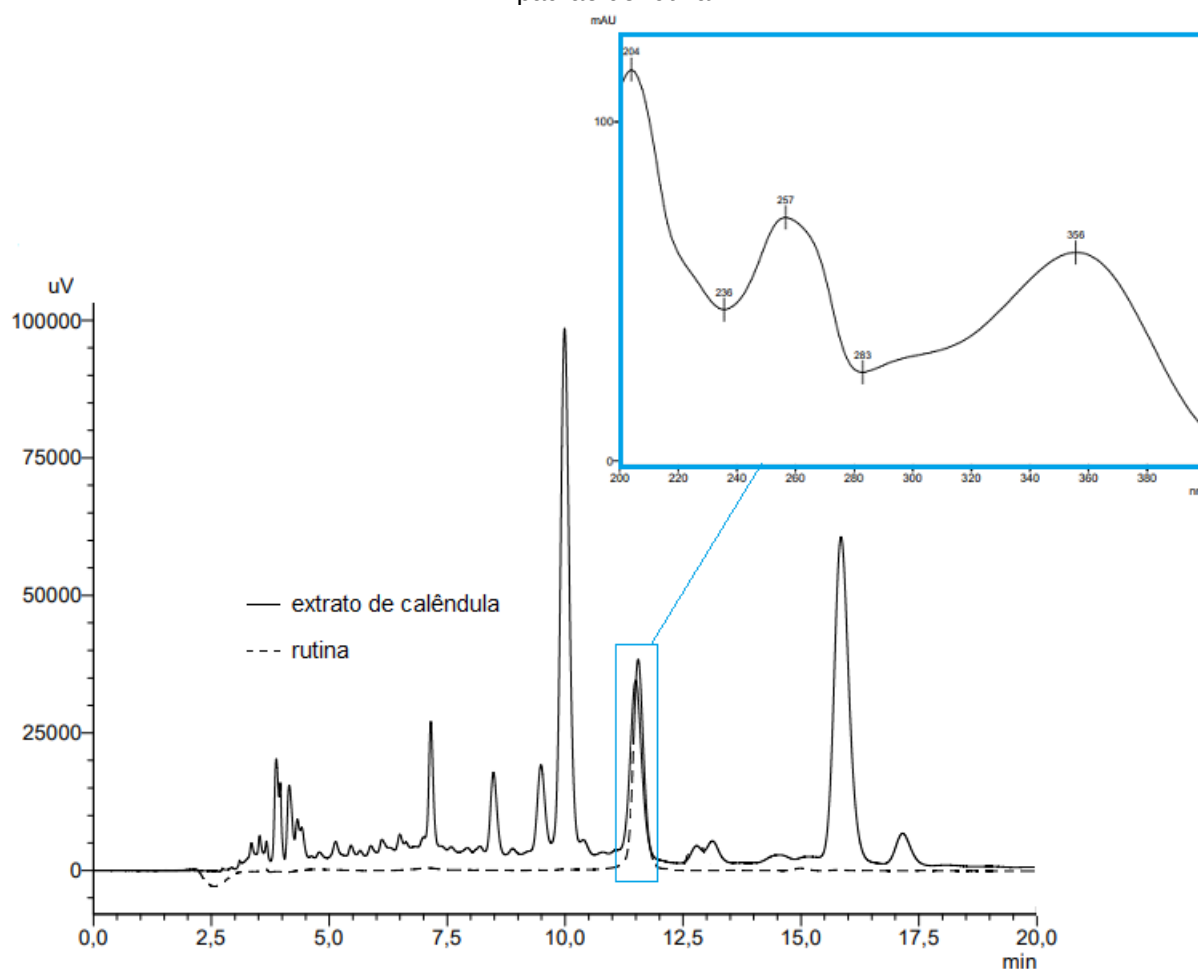
Fonte: A autora.

A quercetina glicosilada e isoramnetina foram descritos como os compostos majoritários entre os flavonoides em extratos metanólicos de flores de calêndula (PICCAGLIA *et al.*, 1997).

A análise de um extrato hidroalcoólico de calêndula por CLAE-DAD revelou a presença de compostos fenólicos, com teor de flavonoides (rutina, quercetina e catequina) maior que o de ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido gálico e vanilina). A rutina foi descrita como o flavonoide majoritário no extrato de calêndula (HERNÁNDEZ-ROSAS *et al*, 2018)

A análise de um padrão de rutina nas mesmas condições cromatográficas resultou na sobreposição da banda do composto 9 (Figura 11) do cromatograma do extrato, sugerindo a presença deste flavonoide. Entretanto, a identificação dos compostos revelados na análise CLAE-DAD precisa ser confirmada por CLAE-MS.

Figura 11 – Fingerprint CLAE-DAD demonstrando aumento da absorção com adição de padrão de rutina



Fonte: A autora.

5.5 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Para o desenvolvimento da formulação foram realizados estudos preliminares com diferentes proporções de soluções de alginato de sódio (1, 1,5, 2 e 3%) e extrato de calêndula (2,5, 5, 10, 15 e 20%). As formulações resultantes não apresentaram viscosidade adequada, permanecendo demasiadamente fluidas em todas as diferentes concentrações e combinações avaliadas, portanto sem as

propriedades adequadas em termos de escoamento e espalhabilidade para um produto de uso tópico.

Para ajustar a viscosidade e a espalhabilidade, avaliou-se o efeito da adição de (CMC) sódica à formulação. A CMC é um polímero derivado da celulose, muito utilizado como espessante, pois é capaz de absorver água e conferir a estrutura gelatinosa à formulação (KARAN, 2019). A influência do percentual de CMC sobre a viscosidade está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Viscosidade das formulações de alginato e CMC

Alginato (%)	CMC (%)	Viscosidade (Pa.s)
1,5	-	10,5
1,5	1,0	25,1
1,5	1,5	58,2
1,5	2,0	96,4

Fonte: A autora

Os resultados dos valores de viscosidade evidenciam que o aumento do % de CMC aumenta a viscosidade do produto, comparado com a formulação controle. Acréscimos de 0,5 % de CMC praticamente duplicaram os valores de viscosidade da formulação. O percentual de 1,0 % (m/v) de CMC foi selecionado como mais adequado em termos de viscosidade.

A influência do solvente utilizado na obtenção do extrato glicólico de calêndula (glicerina e propilenoglicol) sobre a viscosidade da formulação foi avaliada utilizando alginato 1,5% e CMC 1%. Os resultados estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Viscosidade das formulações com extratos glicólicos e calêndula

Extrato glicólico de calêndula (%)	Viscosidade (Pa.s) propilenoglicol	Viscosidade (Pa.s) glicerina
0	25,1	25,1
2,5	23,8	12,4
5,0	21,8	12,6
10	21,2	12,6
15	21,6	11,4

Fonte: A autora

Em mistura com o alginato, polióis como a glicerina e o propilenoglicol atuam como plastificantes, pois reduzem as ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero e assim aumentam o volume molecular livre (SANTANA; KIECKBUSCH, 2013). Com o propilenoglicol como solvente extrator, a redução da viscosidade da formulação foi ligeiramente menor do que com a glicerina. Este efeito poderia ser atribuído ao fato da glicerina possuir um grupo OH adicional, comparado ao propilenoglicol e, conseqüentemente, formar mais interações polares (ligações de hidrogênio) com o alginato, o que acarretaria um efeito significativamente maior sobre a viscosidade.

Após os ensaios de pré-formulação, o hidrogel preparado com alginato de sódio 1,5% (m/v), carboximetilcelulose sódica 1,0% (m/v) e 10% (v/v) de extrato glicólico de calêndula (propilenoglicol:água (9:1)) foi selecionado para os estudos de estabilidade. Essa formulação apresentou-se levemente plástica, de fácil escoamento, ausente de partículas sólidas e grumos, translúcida com coloração amarelo-claro e pH compatível com aplicação tópica, conforme apresentado nos ensaios subsequentes.

5.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

Os dados de estabilidade dos produtos são indispensáveis para assegurar sua qualidade e segurança, além de possibilitar a avaliação do seu desempenho e

possível aceitação pelo consumidor. Através da avaliação da estabilidade é possível obter informações sobre o produto dentro de um intervalo de tempo e sobre diferentes condições a que este possa ser submetido. São estudos preditivos, com resultados não absolutos, porém com grande probabilidade de sucesso (ANVISA, 2004).

Durante o período avaliado (180 dias) as características macroscópicas não tiveram alterações. O produto manteve-se íntegro, gelatinoso, translúcido, levemente amarelado e com ausência de partículas.

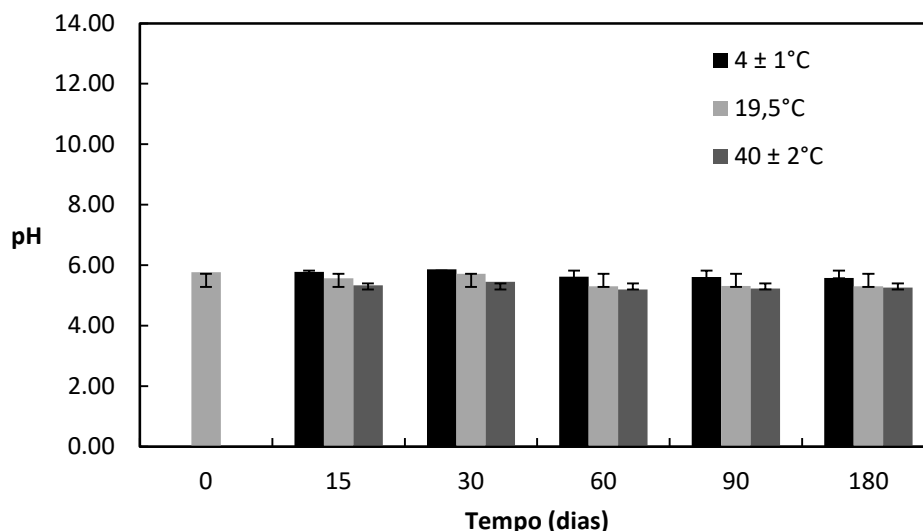
5.6.1 Centrifugação

O teste de centrifugação é um ensaio preliminar que deve ser realizado antes de iniciar os testes de estabilidade. Tem por intuito simular a força da gravidade e produzir estresse à formulação, dessa forma é possível avaliar possíveis instabilidades pela mobilização das partículas. Através deste teste é possível antecipar as seguintes situações de instabilidade: precipitação, separação de fases, formação de aglomerado e coalescência (ANVISA, 2004).

As amostras do hidrogel selecionado foram submetidas à centrifugação a temperatura ambiente por 30 minutos e 3000 rpm. A avaliação visual mostrou que o produto permaneceu estável, sem sinais de precipitação ou separação de fases, estando em conformidade para o prosseguimento dos estudos de estabilidade.

5.6.2 pH

Os valores de pH foram medidos imediatamente após o preparo e após 15, 30, 60, 90 e 180 dias em três diferentes temperaturas de armazenamento. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 12.

Figura 12: pH do hidrogel alginato-calêndula em diferentes condições de armazenamento

Fonte: A autora.

Através dos valores, pode-se observar que não houve variação considerável do pH do hidrogel alginato-calêndula do momento do preparo (tempo 0), considerado com valor de referência para comparação, com os demais dias e condições de temperatura de armazenamento. As pequenas variações são inerentes à precisão do método potenciométrico. Portanto, a formulação manteve o pH estável em torno de 5,76.

A estabilidade do pH é importante pois alterações consideráveis são indicativas de comprometimento da integridade do produto e alteração da estrutura da formulação que não são perceptíveis visualmente podem afetar a eficácia da formulação, indicar problemas de estabilidade entre os princípios ativos ou decorrentes de fabricação (FERREIRA, 2019).

O pH da pele é ligeiramente ácido, em torno de 4,5 a 6,0; podendo variar de acordo com a região do corpo e a idade. Produtos com pH próximo ao da pele são benéficos pelo fato de não agredirem a pele. Um pH muito distante do natural pode provocar desequilíbrio na pele e ser agressivo (DAREZZO, 2017). Portanto os resultados obtidos apresentam-se compatíveis com o tecido cutâneo e adequados para aplicação tópica.

O extrato glicólico calêndula (pH 6,1), adicionado à formulação pode ser o responsável pela acidificação do hidrogel pois a planta possui compostos fenólicos com propriedades ácidas.

A acidez da pele é importante para impedir a colonização de microrganismos, e em feridas o pH ligeiramente ácido preserva as funções celulares, uma vez que a maioria dos produtos liberados pelas células inflamatórias são ácidos. Nas feridas alcalinas a resposta imunológica é mais fraca, levando a infecção microbiológica da lesão (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002; VU *et al.*, 2020). Assim sendo, os processos cicatriciais são favorecidos pelo ambiente ácido do produto, que impede a colonização microbiológica e colabora com a resposta imunológica das células inflamatórias no pH ácido.

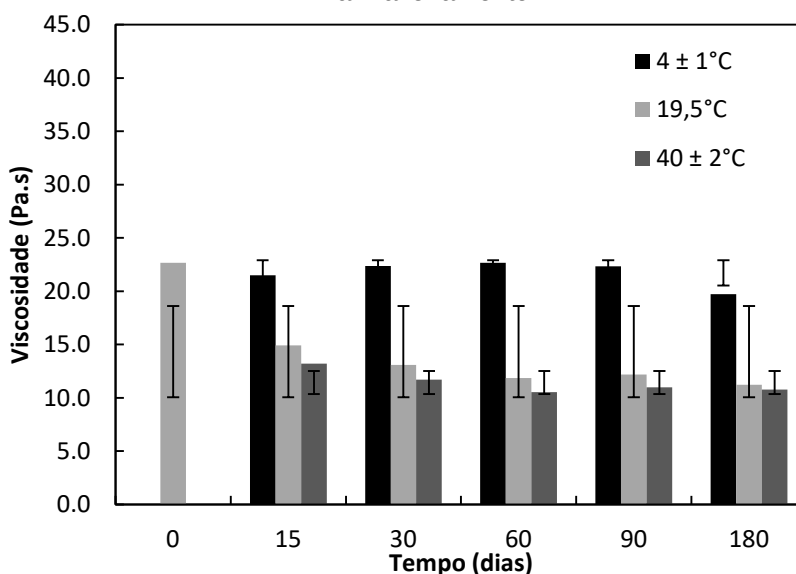
Em contrapartida, se o pH da formulação for neutro ou próximo da neutralidade, além de favorecer o crescimento de microrganismos, poderia comprometer a estabilidade do produto, degradar as matérias-primas e alterar os parâmetros físicos, levando a perda da eficácia do produto (ANDRADE *et al.*, 2005).

As feridas que apresentam um pH mais alcalino, na faixa de 7,15 a 8,9, têm períodos de cicatrização mais longos, pois a síntese de moléculas da matriz extracelular é prejudicada e a resposta imunológica fraca, permitindo a colonização bacteriana e infecção da ferida (MENOITA; SANTOS *et al.*, 2011; VU *et al.*, 2020).

5.6.3 Viscosidade

A viscosidade de amostras de hidrogel alginato-calêndula nas diferentes condições de armazenamento pelo período de 6 meses foi determinada utilizando um viscosímetro Brookfield. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 13.

Figura 13: Viscosidade de amostras do hidrogel alginato-calêndula em diferentes condições de armazenamento.



Fonte: A autora.

O gráfico mostra que a viscosidade das amostras mantidas sobre refrigeração (4 ± 1 °C) permaneceu praticamente constante no decorrer dos 180 dias de avaliação, com a menor variação em relação à amostra de tempo 0 (leitura em temperatura ambiente), considerada como controle para comparação. Com relação às amostras mantidas em temperatura ambiente e em estufa (40 ± 2 °C) observou-se uma redução considerável da viscosidade após 15 dias. No entanto, sem alterações após esse período inicial no restante do tempo de estudo.

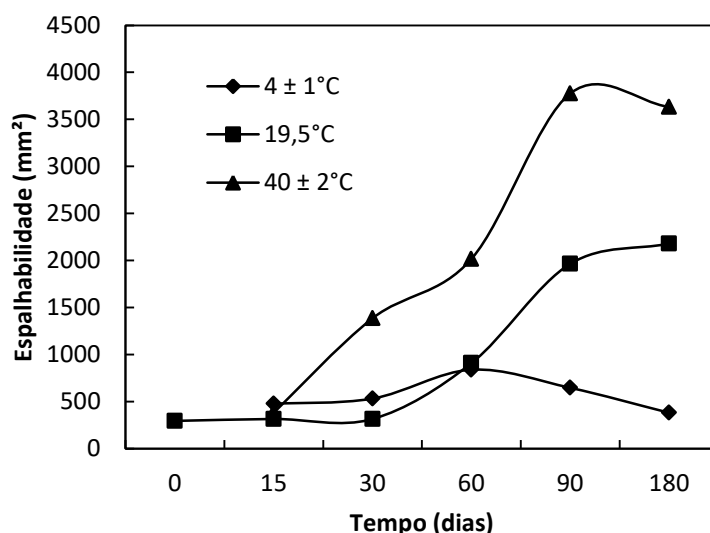
A viscosidade dos hidrogéis utilizados em feridas varia em função das propriedades desejadas. Os mais espessos preenchem e permanecem na cavidade da ferida, enquanto os mais fluidos espalham mais facilmente em uma área maior. Os hidrogéis amorfos são aplicados em maior quantidade sobre ou dentro da ferida e cobertos com um curativo secundário, como uma espuma ou filme (Carville, 2006).

Levando em consideração as características esperadas da formulação, o hidrogel não deve ser muito fluido, a ponto de escorrer da embalagem, e permanecer aderido à pele para exercer o efeito. Por outro lado, não deve ser muito viscoso para que não seja desagradável ao toque e que dificulte espalhar sobre a ferida. Portanto, observando a viscosidade nos diferentes tempos, as formulações que permaneceram acondicionadas de 4 ± 1 °C são as que mantiveram a viscosidade ideal para o uso indicado.

A diminuição da viscosidade, principalmente das amostras mantidas em estufa pode ser explicada pelo fato de que a elevação da temperatura altera as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas (REIS, 2019). No caso de soluções de alginato, a viscosidade diminuiu com o aumento da temperatura e esse efeito é irreversível após exposição prolongada a altas temperaturas (DAY, 1988).

5.6.4 Espalhabilidade

A espalhabilidade é definida como a expansão que uma formulação atinge sobre uma superfície após a aplicação de força em um determinado período de tempo (BORGHETTI; KNORST, 2006). O teste de espalhabilidade foi realizado utilizando lâminas de vidro sobrepostas. Os resultados estão apresentados na Figura 14. As medidas expressam a área total ocupada pelas amostras após a aplicação de pesos conhecidos por um período de tempo determinado.

Figura 14: Espalhabilidade do hidrogel acondicionado em diferentes temperaturas

Fonte: A autora.

Como a espalhabilidade está diretamente relacionada à viscosidade, podemos observar que as amostras mantidas em 40 ± 2 °C apresentaram menor viscosidade e consequentemente maior espalhabilidade. Em contrapartida, as amostras mantidas em refrigerador (4 ± 1 °C) apresentaram maior viscosidade e menor espalhabilidade.

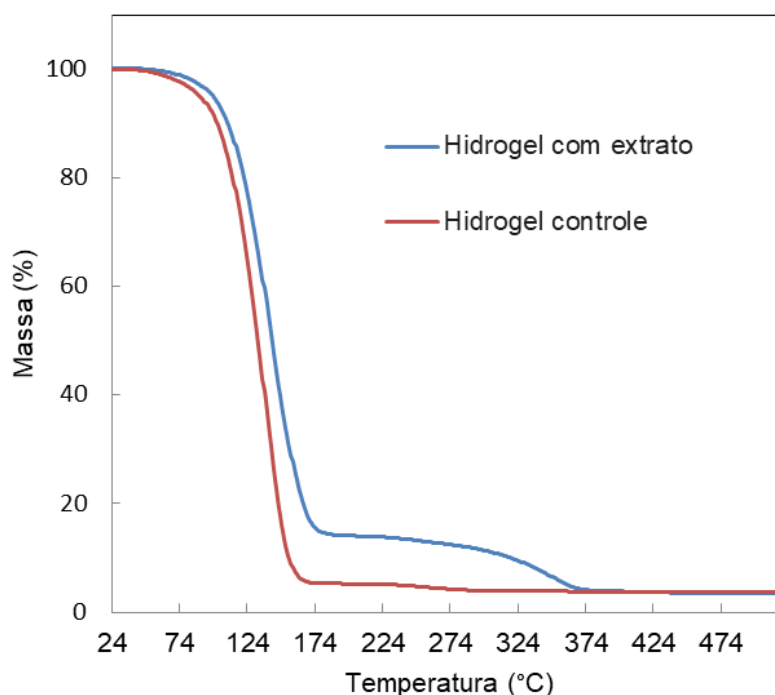
As amostras refrigeradas mantiveram a espalhabilidade praticamente constante no decorrer do tempo, enquanto as amostras armazenadas em temperatura ambiente e em estufa os valores de espalhabilidade aumentaram gradualmente até 90 dias.

A espalhabilidade é uma característica importante para um hidrogel, pois interfere na distribuição do princípio ativo. A uniformidade da aplicação garante a transferência correta da dose no local da aplicação. Além disso, uma espalhabilidade menor é preferível por diminuir a possibilidade de movimentação da formulação no local de aplicação, garantindo maior aderência e maior concentração do ativo para ação na região desejada (GIAROLA, 2015). Portanto, as amostras mantidas a 4 ± 1 °C foram as que apresentaram a espalhabilidade adequada durante o tempo de estudo de estabilidade.

5.7 ANÁLISE TÉRMICA DOS HIDROGÉIS

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada com amostra do hidrogel de alginato-calêndula e com uma amostra controle (sem a adição de extrato glicólico de calêndula) para avaliar a estabilidade térmica da mistura polimérica e a influência do extrato de calêndula. O resultado está apresentado na Figura 15.

Figura 15: Curvas termogravimétricas do hidrogel de alginato



Fonte: A autora

As curvas TG mostram uma considerável perda de massa na faixa de 90 °C a 160 °C em ambas as amostras. Essa perda de massa gradual até 160 °C pode ser explicada pela evaporação da água, o componente em maior proporção na formulação. A água é retida na formulação através de ligações de hidrogênio com grupos polares (carboxila e hidroxila) dos polímeros (alginato e CMC), porém expulsa por evaporação com o aumento da temperatura.

O hidrogel com adição de extrato de calêndula apresentou menor perda de massa do que a do hidrogel controle no intervalo 90-160 °C. A menor perda de massa nessa etapa de degradação indica menor concentração de água livre, que pode ser atribuída à presença do propilenoglicol (solvente do extrato) que atua retendo a água e retardando a evaporação. Assim, a água retida pelo solvente do

extrato requer uma temperatura maior para evaporar. Acima de 180 °C, pode-se deduzir que ocorre a degradação dos polímeros com decomposição gradual com o aumento da temperatura e, no caso do hidrogel com extrato de calêndula, também a evaporação dos compostos alcoólicos orgânicos (polifenóis) do extrato.

Outros compostos voláteis também podem contribuir para curva TG observada na análise (SAFAEI; TARAN; IMANI, 2019; ABBASI *et al.*, 2020). As flores de calêndula contém óleos voláteis (MEHTA *et al.*, 2012) que podem ser evaporados em altas temperaturas.

As análises TG do alginato realizadas por Safaei, Taran e Imani (2019) e Abbasi *et al.* (2020) mostraram que reduções de massa a partir de 285 até 600 °C acontecem pela degradação da estrutura polimérica através da eliminação do grupo carboxila ou por despolimerização. O alginato de sódio se decompõe por desidratação seguida de degradação em carbonato de sódio (Na_2CO_3) e, subsequentemente, em material carbonizado que se decompõe lentamente em temperaturas superiores a 600 °C (SOARES *et al.*, 2004).

5.8 ANÁLISE REOLÓGICA

A reologia estuda o comportamento de materiais sólidos e líquidos diante da aplicação de forças e deformações no decorrer do tempo. Os estudos sobre o fluxo e a deformação da matéria são fundamentais para compreender diversos fenômenos físicos e químicos.

Muitos hidrogéis apresentam um comportamento reológico entre os líquidos e os sólidos, e são classificados como viscoelásticos (CUOMO; COFELICE; LOPEZ, 2019). O método mais comum para analisar as propriedades viscoelásticas de um material é através de um reômetro rotacional com teste de cisalhamento oscilatório. A amplitude da oscilação é igual a tensão ou deformação máxima e a frequência angular representa as oscilações (LIANG; ZHANG, 2015; MALVERN INSTRUMENTS WORLDWIDE, 2016).

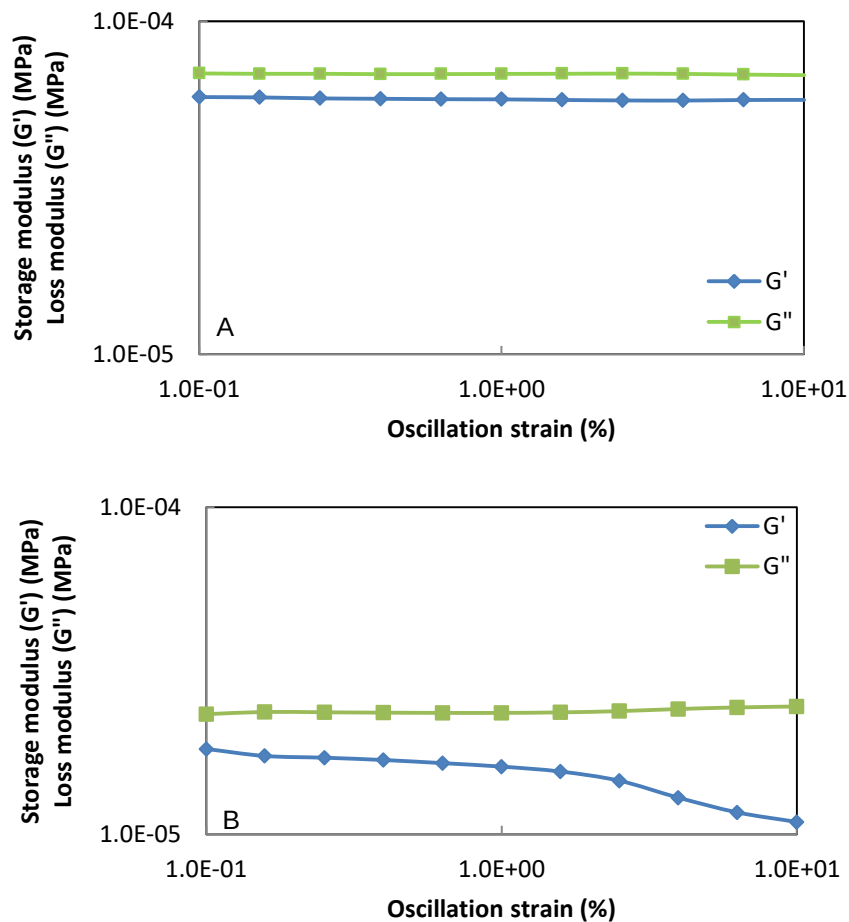
A relação entre a tensão aplicada e a deformação resulta no módulo complexo (G) que mede a resistência do material à deformação. O módulo de armazenamento (G') representa o comportamento elástico, relacionado à capacidade de armazenar energia, enquanto o módulo de perda (G'') representa o comportamento viscoso, relacionado à capacidade de dissipação de energia,

quando um material é submetido à uma deformação (PEREIRA, 2010; BELALIA; DJELALI, 2014).

Os hidrogéis consistem de redes tridimensionais de moléculas de polímeros interligadas. Dependendo dos grupos químicos que interagem, essas ligações podem ser fracas ou fortes, e a rede pode ser mais ou menos densa dependendo da formulação do hidrogel (JONES; VAUGHAN, 2005).

As amostras do hidrogel controle e do hidrogel alginato-calêndula foram submetidas a análise reológica oscilatória à 37 °C. Observa-se (Figura 16) que ambas as formulações apresentam caráter viscoso (G'') maior que o caráter elástico (G') de forma praticamente constante. Uma formulação predominantemente viscosa quando submetida à pressão é mais adequada para aplicação tópica, pois a maneira como será aplicada e a força empregada (frequência oscilatória) poderia alterar a percepção da textura (LUNGATTO *et al.*, 2014; BOAVENTURA, 2022).

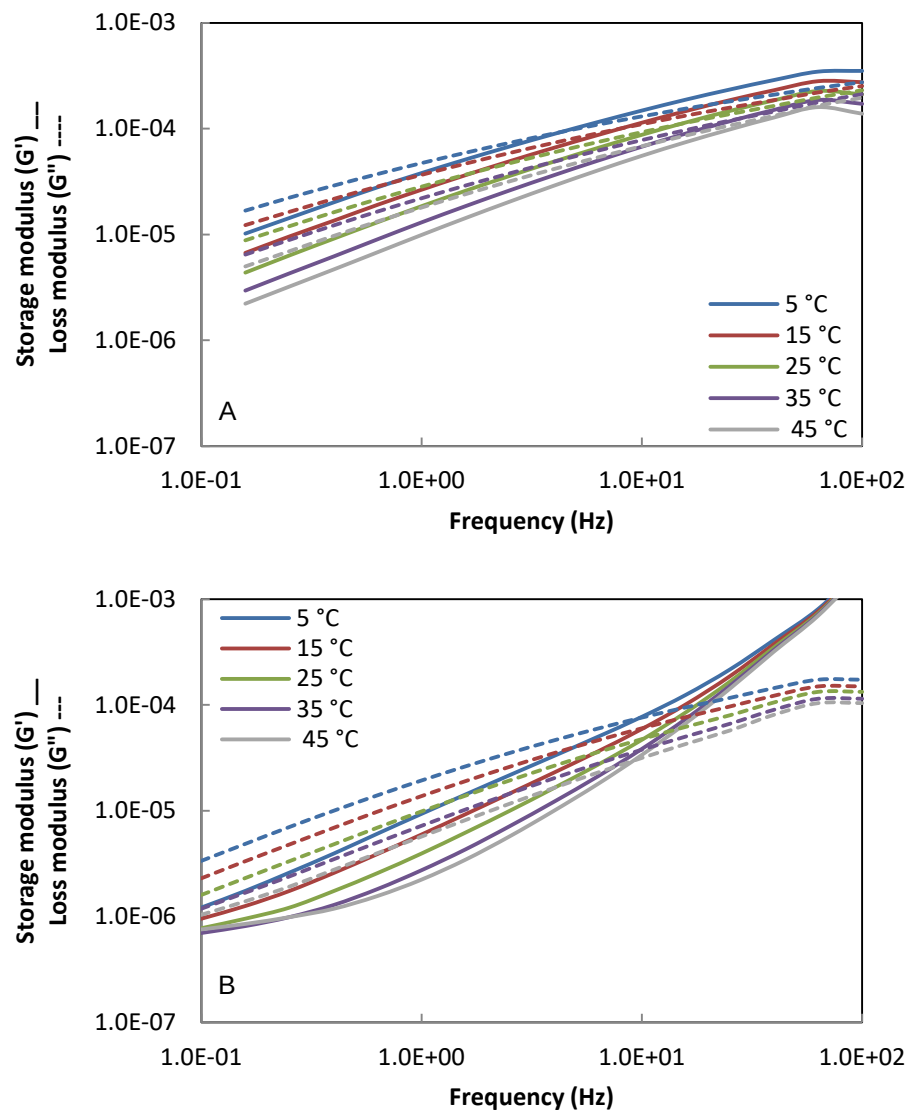
Figura 16: Análise reológica oscilatória dos hidrogéis de alginato à 37 °C.



Fonte: A autora. (A) Hidrogel controle (B) Hidrogel alginato-calêndula.

A determinação dos módulos elástico e viscoso e a viscosidade complexa em função da frequência angular foram realizadas com o hidrogel de alginato (hidrogel controle) e o hidrogel de alginato-calêndula no intervalo de 5 a 45 °C (Figura 17). É possível notar que em baixas frequências existe a predominância do caráter viscoso ($G'' > G'$).

Figura 17: Comportamento reológico do hidrogel de alginato e hidrogel alginato-calêndula com variação de temperatura de 5 a 45 °C.



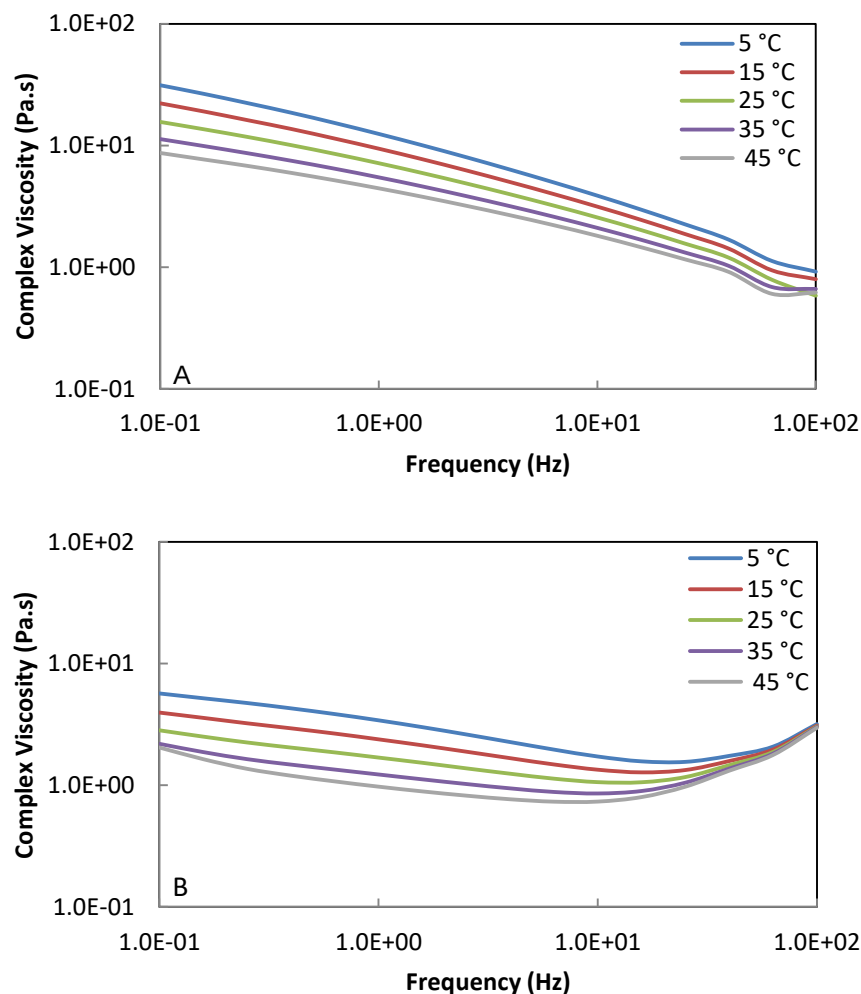
Fonte: A autora. (A) Hidrogel controle (B) Hidrogel alginato-calêndula.

Com o aumento da frequência observa-se a inversão (cross-over), no qual o módulo de armazenamento supera o módulo de perda ($G' > G''$) (RABELO; ARAÚJO, 2021), predominando o caráter elástico com a diminuição da viscosidade complexa.

O estudo de Storz *et al.* (2009) que investigou as propriedades viscoelásticas de soluções de alginato demonstrou que em baixas frequências o módulo de perda G'' está acima do módulo de armazenamento G' , prevalecendo um comportamento viscoso. De acordo com sua progressão, em uma determinada frequência as curvas se cruzam passando a ter um comportamento elástico predominante.

A viscosidade complexa das amostras foi avaliada em relação a frequência, como observado na Figura 18. O extrato de calêndula no hidrogel diminuiu o valores de viscosidade, possivelmente tornando a rede polimérica mais fraca e flexível, resultando em um comportamento viscoso mais dominante. Além disso, o aumento da temperatura pode afetar outras propriedades do hidrogel, como sua estabilidade e sua capacidade de retenção de água, e deve ser considerado em conjunto com outras propriedades do material.

Figura 18: Viscosidade complexa do hidrogel alginato e hidrogel alginato-calêndula com variação de temperatura de 5 a 45 °C.



Fonte: A autora. (A) Hidrogel controle (B) Hidrogel alginato-calêndula.

A diminuição da viscosidade complexa de um hidrogel com o aumento da temperatura é um comportamento comum observado em materiais viscoelásticos (CUOMO; COFELICE; LOPEZ, 2019). Quando o hidrogel de alginato é submetido a tensão, a estrutura se deforma e as moléculas de polímero são forçadas a se mover umas em relação às outras. A viscosidade do hidrogel é a resistência que essas moléculas oferecem ao movimento relativo, e é influenciada por fatores como a temperatura e a frequência da tensão aplicada (SHAW; MACKNIGHT, 2005).

O aumento da temperatura das amostras de hidrogel faz com que as moléculas dos polímeros da formulação se movam mais rapidamente, o que reduz a viscosidade. Isso ocorre porque o movimento térmico aumenta a energia cinética das moléculas, o que reduz a força das interações moleculares e permite que as moléculas se movam com mais facilidade. Como resultado, a viscosidade complexa diminui com o aumento da temperatura (SHAW; MACKNIGHT, 2005).

5.9 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

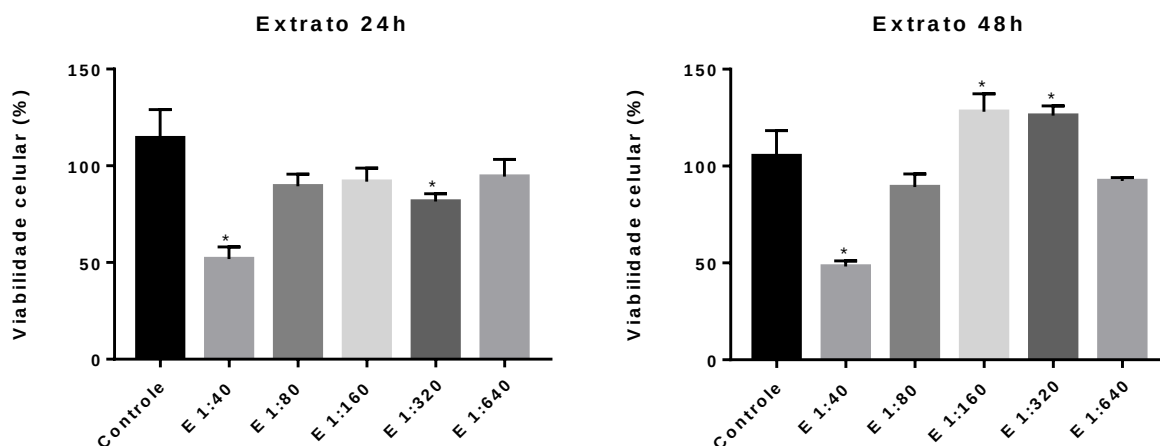
5.9.1 Avaliação da viabilidade celular pelo teste colorimétrico do metiltetrazólio (MTT)

O ensaio de MTT é um método prático para a triagem da proliferação, viabilidade e toxicidade celular de compostos bioativos. O corante amarelo é reduzido a um precipitado de formazan de cor púrpura, permeável à membrana celular, analisado colorimetricamente após dissolução em solvente orgânico. A produção do MTT-formazan está relacionada ao número de células metabolicamente ativas, sendo o complexo mitocondrial um dos principais sítios de redução do MTT. No entanto, a redução do MTT ocorre em toda a célula, podendo ser citosólica ou microssomal (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

O ensaio MTT foi realizado com células de fibroblastos 3T3, submetidas ao tratamento com diferentes diluições do extrato glicólico de calêndula e do hidrogel alginato-calêndula. Os estudos foram realizados com diluições de 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640. A média dos valores de experimentos independentes realizados sob as mesmas condições demonstrou que após 24h de exposição ao tratamento com o extrato de calêndula (Figura 14) houve diminuição da viabilidade dos fibroblastos em relação ao controle (células mantidas em meio DMEM) na diluição 1:40 e 1:320.

Após 48h de exposição dos fibroblastos 3T3 ao tratamento com o extrato glicólico de calêndula ocorreu aumento da viabilidade com as diluições de 1:160 e 1:320, conforme demonstrado no gráfico da Figura 19. Dessa forma, acredita-se que o extrato pode ser benéfico para viabilidade celular.

Figura 19: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com extrato de calêndula pelo método MTT

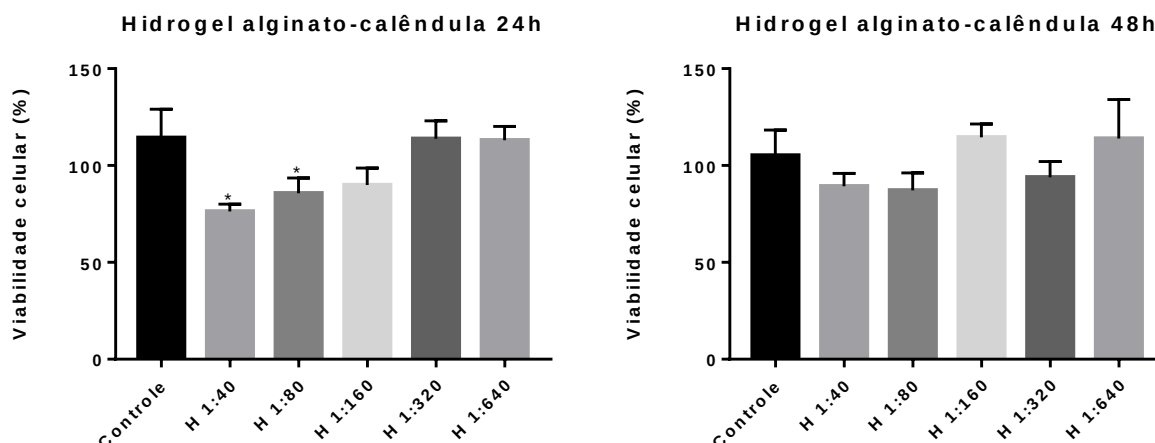


Fonte: A autora.

Nota: Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Como controle foi utilizado meio de cultura DMEM. * significa diferença estatística em relação ao controle (células em condições de cultivo) com $p < 0,05$.

Os experimentos da exposição dos fibroblastos 3T3 ao hidrogel alginato-calêndula (Figura 20) mostram uma diminuição na viabilidade após 24h nas diluições 1:40 e 1:80 em relação ao controle. Entretanto, após 48h de exposição, não houve diferenças significativas na viabilidade celular das diferentes diluições de tratamento comparados ao controle.

Figura 20: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com hidrogel alginato-calêndula pelo método MTT



Fonte: A autora.

Nota: Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Como controle foi utilizado meio de cultura DMEM. * significa diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$.

Apesar do extrato glicólico ter causado diminuição da viabilidade celular pelo método MTT no ensaio de 24h, a proporção do extrato no hidrogel alginato-calêndula é de 10% (v/v), o que significa que no hidrogel a diluição corresponde a 1:400. Dessa maneira, as avaliações de viabilidade celular permitem concluir que não há citotoxicidade, com preservação dos fibroblastos no tratamento com o hidrogel de alginato-calêndula, após 24 e 48 horas de exposição.

Em geral, a calêndula apresenta baixa citotoxicidade. O estudo de Matta *et al.* (2022) com células de fibroblasto gengivais humanas tratadas com óleo de calêndula, não revelou efeito citotóxico. O estudo de Hormozi *et al.* (2019) com o ensaio MTT também demonstrou que os extratos metanólico e etanólico de calêndula em diferentes concentrações não afetam a viabilidade de células embrionárias de fibroblastos de camundongos.

Outro aspecto relevante é que o método MTT está relacionado com o metabolismo celular. O MTT é reduzido principalmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, porém alterações enzimáticas de oxidorredução mitocondriais ou não, perturbações metabólicas e energéticas e estresse oxidativo podem interferir na interpretação do ensaio de MTT (BERRIDGE *et al.*, 2005). Portanto, deve-se estar atento em avaliações de alterações de viabilidade celular, pois poderão ocorrer alterações metabólicas e não uma alteração real de viabilidade (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

Sims; Plattner (2009) mostra a inconsistência do ensaio de MTT quando comparados com outros métodos, uma vez que ensaios de proliferação e apoptose para droga Imatinibe mostraram um número reduzido de células, demonstrando que diversos componentes são capazes de alterar o metabolismo celular, havendo um aumento da conversão do sal (MTT) em formazan, mas que não corresponde ao aumento do número de células.

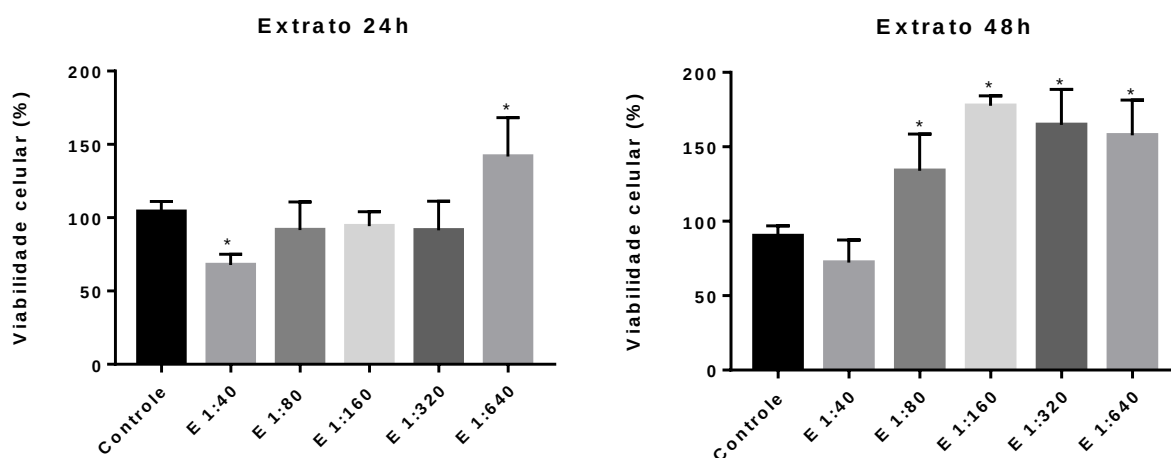
Por isso, a avaliação da viabilidade por outros métodos é conveniente para verificar a veracidade dos resultados obtidos através do ensaio de MTT.

5.9.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio da sulforodamina B (SRB)

O método com sulforodamina B é amplamente utilizado para triagem de citotoxicidade *in vitro*, baseia-se na capacidade do corante em se ligar a componentes proteicos de células. A quantidade de corante extraída das células coradas é diretamente proporcional à massa celular de proteínas, e, portanto, correlacionada ao número de células viáveis. Este método, ao contrário do MTT, não requer atividade metabólica (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Trata-se de um método conveniente para avaliar a citotoxicidade de extratos de plantas, uma vez que o efeito citotóxico pode ser evidenciado após um curto período de incubação (TAYLOR et al., 2013).

Os fibroblastos de linhagem 3T3 foram expostos à diferentes diluições (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) de extrato glicólico de calêndula e avaliados pelo ensaio com SRB após 24 e 48h. Para verificar a viabilidade e citotoxicidade, foram realizados experimentos independentes nas mesmas condições. Os resultados estão no gráfico da Figura 21.

Figura 21: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com extrato de calêndula pelo método SRB



Fonte: A autora.

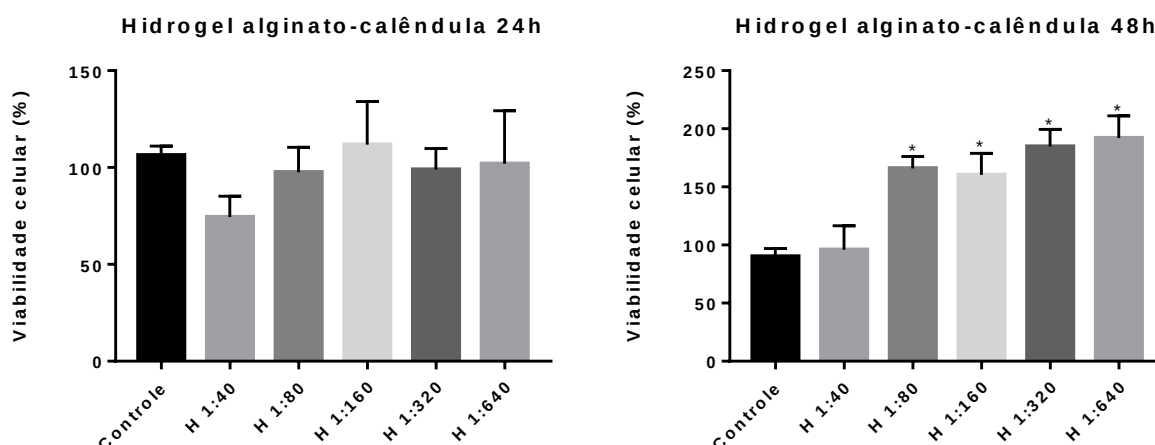
Nota: Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Como controle foi utilizado meio de cultura DMEM.

* significa diferença estatística em relação ao controle (células em condições de cultivo) com $p < 0,05$.

Após 24h de tratamento (Figura 20), houve diminuição da viabilidade celular em comparação com o controle nas condições de cultivo (DMEM) com o extrato glicólico de calêndula apenas na menor diluição (1:40). Na maior diluição do extrato glicólico (1:640), houve aumento da viabilidade. Com 48h de tratamento, observa-se aumento da viabilidade nas diluições a partir de 1:80 do extrato glicólico. Na diluição 1:40 não foi observado diferença estatística em relação ao controle das células mantidas em meio DMEM, indicando que a viabilidade celular foi mantida.

Os resultados após 24h de tratamento com o hidrogel alginato-calêndula manteve a viabilidade celular sem diferenças estatísticas comparadas ao controle de cultivo DMEM. No entanto, decorridas 48h observa-se o aumento da viabilidade em relação ao meio de cultivo DMEM nas diluições a partir de 1:80. A diluição do hidrogel alginato-calêndula 1:40 foi a única que não apresentou aumento da viabilidade, bem como, não houve diferença estatística em relação ao controle nas condições de cultivo. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

Figura 22: Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com hidrogel alginato-calêndula pelo método SRB



Fonte: A autora.

Nota: Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Como controle foi utilizado meio de cultura DMEM. * significa diferença estatística em relação ao controle (células em condições de cultivo) com $p < 0,05$.

Os resultados obtidos com o hidrogel de alginato-calêndula demonstram que a formulação não é citotóxica nos ensaios realizados. No ensaio de 48h com a SRB, onde houve aumento da viabilidade celular, podemos supor que os componentes do hidrogel poderiam beneficiar de alguma maneira o processo cicatricial.

Ao comparar o efeito sobre os fibroblastos 3T3 do extrato glicólico de calêndula com o hidrogel alginato-calêndula, observa-se que o hidrogel não diminui a viabilidade celular em nenhuma das diluições avaliadas. O ensaio com a SRB, conforme evidenciado por Vichai e Kirtikara (2006), fornece maior segurança, sensibilidade, reprodutibilidade e linearidade; confirmando os resultados obtidos com MTT de que a formulação do hidrogel alginato-calêndula não causa morte celular.

6 CONCLUSÃO

O material botânico utilizado apresentou os marcadores característicos das flores de *Calendula officinalis* L. e teor de flavonoides de acordo com o referenciado na literatura. A melhor solução extratora selecionada para o preparo dos extratos glicólicos foi a mistura propilenoglicol:água, no qual o percentual de água na mistura pode variar de 10 a 30 % (v/v). A análise qualitativa do extrato glicólico por UV-vis e o *fingerprint* por CLAE-DAD evidenciaram a presença de compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos. Nos ensaios de estabilidade, o hidrogel alginato-calêndula permaneceu estável durante o período de avaliação quando mantido sob refrigeração. Na temperatura ambiente e a 40 °C houve redução da viscosidade e aumento da espalhabilidade. Através das análises reológicas pode-se confirmar a diminuição da viscosidade complexa com o aumento da temperatura, sendo o módulo de perda superior ao módulo de armazenamento, e portanto, com prevalência de caráter viscoso. Os ensaios de citotoxicidade com MTT e SRB em fibroblastos murinos 3T3 evidenciaram que não houve citotoxicidade com o extrato de calêndula nas diluições a partir de 1:80. Em ambas as avaliações, o hidrogel de alginato calêndula não alterou a viabilidade celular. Além disso, o ensaio com SRB indicou um aumento da viabilidade celular que pode ser atribuído aos componentes do hidrogel alginato-calêndula.

REFERÊNCIAS

- ABASALIZADEH, Farhad *et al.* Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. **Journal Of Biological Engineering**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1-22, 13 mar. 2020.
- ABBASI, Asma Riaz *et al.* Bioinspired sodium alginate based thermosensitive hydrogel membranes for accelerated wound healing. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 155, p. 751-765, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.248>.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52 p. ; 20 x 27 cm. -- (Série Qualidade em Cosméticos ; v. 1)
- ALBERTS, B; JOHNSON; LEWIS; MORGAN; RAFF; ROBERTS; WALTER. **Biologia Molecular da Célula** . 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. *Revista Amazônia Science & Health* v. 3, n. 4, p. 36-43, 2015.
- AMSDEN, B.; TURNER, N. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 65, p. 605-610, 1999.
- ANDERSEN, F. Alan *et al.* Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel Amended Safety Assessment of Calendula officinalis—Derived Cosmetic Ingredients. **International Journal Of Toxicology**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 221-243, nov. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1091581810384883>.
- ANDRADE, F. R. O. *et al.* Análises microbiológicas de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. *Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia*, v. 2, p. 1-7, nov. 2005.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**, 1º Ed. Brasília, 2011.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira, 6ª Edição**, Brasília, 2019.
- ARAÚJO, M. E. M. B. **Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação in vitro de sua bioatividade** . (tese doutorado em Ciências da Saúde). Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2016.
- ARORA, Disha; RANI, Anita; SHARMA, Anupam. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. **Pharmacognosy Reviews**, [S.L.], v. 7, n. 14, p. 179, 2013. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.120520>.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 41, n. 1, p.

27-51, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322005000100004>.

BEHLING, E. B.; *et al.* Flavonoide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004

BELALIA, Fatiha; DJELALI, Nacer-Eddine. Rheological properties of sodium alginate solutions. **Revue Roumaine de Chimie**, Algeria, v. 2, n. 59, p. 135-145, 23 jan. 2014.

BENTOS, C. O. G. **Obtenção e caracterização de filmes de alginato contendo extrato de *Calendula officinalis* L.** 2018. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

BLANES, Leila. **Tratamento de feridas**. São Paulo: Baptista-Silva JCC, 2004. 23 p. Disponível em: <http://files.artedecuidar.webnode.com.br/200000015-0ad7c0b337/Tratamento%20de%20Feridas.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2021.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BOAVENTURA, G. **Reologia e viscosidade de cosméticos**. 2022. Disponível em: <https://cosmeticaemfoco.com.br/artigos/o-que-e-reologia/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

BOHM, B.A.; Chemistry and biochemistry of organic natural products. Introduction to flavonoids. Editora Harwood academic publishers, India, 1998. 339-65

BORGES, D.B. *et al.* Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 229-236, set. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2005000300013>.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, 2006.

BORTOLO, D.P.G.; MARQUES, P.A.A.; PACHECO, A.C.. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 435-441, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722009000400012>.

BREDER, Jessica da Silva Cunha. **Efeito do tratamento tópico com membrana de quitosana e alginato em ferida de camundongos diabéticos**. 2017. 34 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Enfermagem, Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

BUZZI, M.; FREITAS, F. de; WINTER, M. de Barros. Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. **Journal Of Wound Care**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 732-739, 2 dez. 2016. Mark Allen Group. <http://dx.doi.org/10.12968/jowc.2016.25.12.732>.

CARVILLE, Keryln. Which dressing should I use it all depends on the timeing. **Reprinted From Australian Family Physician**, [S.L.], v. 35, n. 7, p. 486-489, jul. 2006.

Covington, A., *Tanning Chemistry: The Science of Leather*, The University of Northampton, Northampton, Published by The Royal Society of Chemistry, UK, 2009. CRUZ, C. H.G.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quím. Nova**. v. 31, São Paulo, 2008.

CUOMO, Francesca; COFELICE, Martina; LOPEZ, Francesco. Rheological Characterization of Hydrogels from Alginate-Based Nanodispersion. **Polymers**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 259, 3 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11020259>.

DAREZZO, A. Importância do ph nas formulações, 2017. Disponível em: <<https://www.quimicadabeleza.com/a-importancia-do-ph-nas-formulacoes/>>. Acesso em: 08/2022

Day, D. F. Alginates. *In* Biopolymers from Renewable Resources Kaplan, D. L.; Springer, San Diego, USA, 1998.

DINDA, Manikarna *et al.* PI3K-Mediated Proliferation of Fibroblasts by *Calendula officinalis* Tincture: implication in wound healing. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 607-616, 13 jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5293>.

DINDA, Manikarna *et al.* The Water Fraction of *Calendula officinalis* Hydroethanol Extract Stimulates *In Vitro* and *In Vivo* Proliferation of Dermal Fibroblasts in Wound Healing. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 1696-1707, 18 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5678>.

DURAN, V *et al.* Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. **International Journal Of Tissue Reactions-Experimental And Clinical Aspects**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 101-106, 01 jan. 2005.

ERTESVÁG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.

FERREIRA, E. **Desenvolvimento e avaliação de hidrogel baseado em Poloxamer-Quitosana contendo Eugenol para aplicação na mucosa bucal**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-73312014000200004>.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 203-206, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69912008000300013>.

FRONZA, M. *et al.* Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 126, n. 3, p. 463-467, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.014>.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**. v. 114, p. 1-14, 2006.

GIAROLA, L.R. Explorando a biodiversidade brasileira e os conhecimentos populares: desenvolvimento de formulação para uso tópico com extrato de *Pterodon pubescens* benth. (sucupira). 2015. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade Estadual de Campinas, 2015.

GIVOL, Or *et al.* A systematic review of Calendula officinalis extract for wound healing. **Wound Repair And Regeneration**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 548-561, 20 jun. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12737>.

GOMES, Danielle Santos *et al.* Comparação do teor de flavonoides de *Calêndula officinalis* em cultivo orgânico em diferentes estações. **Revista Diálogos Interdisciplinares**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 75-89, 2018.

GONÇALVES, A.P. Envelhecimento cutâneo cronológico. **Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia**. v.66, p.4-6, 1991.

GYLES, Desireé Alesa *et al.* Polyacrylamide-Metilcellulose Hydrogels Containing Aloe barbadensis Extract as Dressing for Treatment of Chronic Cutaneous Skin Lesions. **Polymers**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 690, 19 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym12030690>.

HERNÁNDEZ-ROSAS, Nancy Aline *et al.* Perfil de polifenoles, capacidad antioxidante y efecto citotóxico in vitro en líneas celulares humanas de un extracto hidroalcohólico de pétalos de Calendula officinalis L. **Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 54-64, 26 jun. 2018. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. <http://dx.doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.150>.

HONÓRIO, Isabela Cristina Gomes *et al.* Growth, development and content of flavonoids in calendula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**,

[S.L.], v. 38, n. 1, p. 69, 1 jan. 2016. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i1.25976>.

Hormozi, M., Gholami, M., Babaniazi, A. *et al.* *Calendula officinalis* stimulate proliferation of mouse embryonic fibroblasts via expression of growth factors TGF β 1 and bFGF. *Inflamm Regener* **39**, 7 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0097-x>

JONES, Annie; VAUGHAN, David. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: a review. **Journal Of Orthopaedic Nursing**, [S.L.], v. 9, p. 1-11, dez. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1361-3111\(05\)80001-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1361-3111(05)80001-9).

JUNQUEIRA, L. C.; CANEIRO, J. **Histologia Básica**, 12^a edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2013.

KARAN. T. D. In: Handbook of pharmaceutical wet granulation, Academic Press, 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-810460-6.00014-2.

KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S.; PARKE, I. Y.; KIM, B. C.; CHO, C. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n., p. 1-21, 2008.

KISHIMOTO, Sanae *et al.* Analysis of Carotenoid Composition in Petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.L.], v. 69, n. 11, p. 2122-2128, jan. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.69.2122>.

KNORST, M. T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* Lam. DC. Compositae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

KOGA, A. Y.; PEREIRA, A. V.; LIPINKI, L. C. *et al.* Evaluation of wound healing effect of alginate film containing Aloe vera gel and cross-linked with zinc chloride¹. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2020.

KOGA, A. Y.; PEREIRA, A. V.; LIPINKI, L. C.; OLIVEIRA, M. R. Evaluation of wound healing effect of alginate films containing Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. **J Biomater Appl.** 32(9):1212-1221. 2018.

LIAKOS, I. *et al.* Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents. **Journal of Materials Chemistry**, v.3, p.1583-1589, 2015.

LIANG, Jie; ZHANG, Xing-Hua. Rheological Properties of SP in Shock Transmission Application. **Journal Of Materials In Civil Engineering**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 1-7, set. 2015. American Society of Civil Engineers (ASCE). [http://dx.doi.org/10.1061/\(asce\)mt.1943-5533.0001227](http://dx.doi.org/10.1061/(asce)mt.1943-5533.0001227).

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH

da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 77, n. 5, set-out. 2002.

LUNGATTO, Maria Cibelle Pauli *et al.* Formulations with green clay for acne-prone skin: evaluation of rheology and sensory. **Biomedical And Biopharmaceutical Research**, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 237-246, nov. 2014.

MALVERN INSTRUMENTS WORLDWIDE (org.). **Understanding Yield Stress Measurements. Whitepaper**, Worcestershire, Uk, p. 1-20, 2016.

MALVERN INSTRUMENTS WORLDWIDE (org.). **A Basic Introduction to Rheology. Whitepaper**, Worcestershire, Uk, p. 1-20, 2016.

MATHESIUS, Ulrike. Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. **Plants**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 30, 3 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants7020030>.

MATTA, Bharath Kumar Ayyanahalli *et al.* Comparative Evaluation of the Effectiveness of a Combination of Absorbable Gelatin Sponge and Calendula officinalis with Absorbable Gelatin Sponge Used Alone as a Hemostatic Agent—An In-Vitro Study. **Dentistry Journal**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 76, 5 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/dj10050076>.

MAURSTAD, G.; MORCH, Y. A.; BAUSCH, A. R.; STOKKE, B. T. Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate–chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 672–681, 2008.

MEHTA, Devansh *et al.* Review on Pharmacological Update: Calendula officinalis Linn. **Inventi Impact: Planta Activa**, [s. l], v. 2012, n. 4, p. 195-202, out. 2012.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An bras Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 84, n 3, p. 257-262, 2009.

MENOITA, E., SANTOS, V., SANTOS, A., GOMES C. pH no controle do microambiente das feridas crônicas. Coimbra, Sinais Vitais, p. 54-61, 2011.

MILIAN, L.H. **Formulação e caracterização de um hidrogel de alginato com gel de babosa com potencial efeito cicatrizante**. 2020. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA. **Monografia da espécie *Calendula officinalis* L. (CALÊNDULA)**. Brasília, 2014.

MOGOSANU, G.D.; GRUMEZESCU, A.M., Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics** , v.463, p.127- 136, 2014.

MORE, Lucila Fernandes IV. ARRUDA, Suzana Schmidt de. FLORIANÓPOLIS. Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância em Saúde. Protocolo de cuidados de feridas. Florianópolis: IOESC, 2007.

Mulder GD, Albert SF, Grimwood RE. **Clinical evaluation of a new occlusive hydrocolloid dressing**. Cutis. 1985 Apr;35(4):396-7, 400.

NELIGAN, P. C.; GURTNER, G. C. **Cirurgia plástica: princípios**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1077 p.

NEVES, Sara C. *et al.* Leveling Up Hydrogels: hybrid systems in tissue engineering. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 292-315, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.004>.

OKUMA, C.H. **Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamela à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos**. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

OLIVEIRA, C. M. B. D., SAKATA, R. K., ISSY, A. M., GEROLA, L. R., & SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

PACHECO, A. C. Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

PARENTE, Leila Maria Leal *et al.* Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 19-24, fev. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502011000100005>.

PARENTE, Leila Maria Leal *et al.* Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2012, p. 1-7, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/375671>.

PEREIRA, Gonçalo José dos Reis. **Reologia de Fluidos Complexos**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Materiais, Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

PICCAGLIA, Roberta *et al.* Effects of Harvesting Date and Climate on the Flavonoid and Carotenoid Contents of Marigold (*Calendula officinalis* L.). **Flavour And Fragrance Journal**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 85-90, mar. 1997. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1026\(199703\)12:23.0.co;2-l](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1099-1026(199703)12:23.0.co;2-l).

PREETHI, K.C.; KUTTAN, R.. Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. **Journal Of Basic And Clinical Physiology And Pharmacology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 73-79, jan. 2009. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/jbcpp.2009.20.1.73>.

RABELO, Jéssica Fernanda; ARAÚJO, Rogério Gomes. **Análise do comportamento reológico de resinas compostas odontológicas com diferentes teores de carga**. 2021. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Centro Universitário Unisociesc, Joinville, 2021.

REIS, Tamara. **Síntese de hidrogéis de alginato reticulados com nanofibras de lactato de cálcio/poli(óxido de etileno) obtidas por eletrofiação**. 2019. 56 f. TCC (Graduação) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SACKHEIM, K.; ARAUJO, T. S.; ROBERT S. KIRSNER.. Compression modalities and dressings: their use in venous ulcers. *Dermatologic Therapy*, V. 19, 2006.

SAFAEI, Mohsen; TARAN, Mojtaba; IMANI, Mohammad Moslem. Preparation, structural characterization, thermal properties and antifungal activity of alginate-CuO bionanocomposite. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 101, p. 323-329, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.108>.

SANTANA, A. A.; KIECKBUSCH, T. G.. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 835-845, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-66322013000400015>.

SHAFEIE, Nazanin; NAINI, Abotorab Tabatabai; JAHROMI, Hossein. Comparison of different concentrations of calendula officinalis gel on cutaneous wound healing. **Biomedical And Pharmacology Journal**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 979-992, 25 dez. 2015. Oriental Scientific Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/850>.

SHAW, Montgomery T.; MACKNIGHT, William J.. **Introduction to Polymer Viscoelasticity**. 3. ed. United States Of America: Wiley-Interscience, 2005. 327 p.

SILVA, M.S. **Análise bioquímica e funcional da bandagem bucal antimicrobiana**. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

SOARES, J. P.; SANTOS, J. E.; CHIERICE, G. O.; CAVALHEIRO, E. T. G.. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclética Química**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 57-64, 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-46702004000200009>.

SOUZA, A.; BARNI, S.; FERREIRA, R.; COUTO, A. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas hidro etanólicas das flores de Calendula officinalis L. empregando planejamento fatorial. *Latin American Journal of Pharmacy*. v.29, p.13-21, 2010.

SOUZA, T. D. C. **Análise de curativo de membrana de celulose vegetal incorporada com alginato de sódio na cicatrização de lesões cutânea**. 2019. 69 f. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019

STALIKAS, Constantine D.. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 30, n. 18, p. 3268-3295, dez. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200700261>.

STEPANENKO, A.A.; DMITRENKO, V.V.. Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, [S.L.], v. 574, n. 2, p. 193-203, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>.

STORZ, Henning *et al.* Viscoelastic properties of ultra-high viscosity alginates. **Rheologica Acta**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 155-167, 10 dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00397-009-0400-x>.

TAYLOR, P *et al.* Screening of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Cytostatic and Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines. **Phytother Res**, v.27, p.530–539, 2013.

VASCONCELOS, C. M. **Avaliação da migração celular, atividade antiinflamatória e antimicrobiana da Hyptis pectinata L.Poit.: estudos *in vitro* e *in vivo* com vistas ao tratamento de feridas**. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Escola de Enfermagem e Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 1112-1116, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.

VU, H. *et al.* A Device to predict short-term healing outcome of chronic wound. **Advances in Wound Care**, v. 9, n. 6, p. 312-323, 2020.

WEATHER SPARK. **Clima e condições meteorológicas médias em Ponta Grossa no ano todo**. 2022. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/29814/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Ponta-Grossa-Brasil-durante-o-ano#Figures-Temperature>. Acesso em: 22 dez. 2022.

YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I. V. Modern wound dressings: manufacturing and properties. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 40, n. 2, p. 85-92, 2006.

ZHANG, Miao; ZHAO, Xia. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 162, p. 1414-1428, nov. 2020. Elsevier BV.