

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

RAYZA ASSIS DE ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO CONTENDO GEL DE
BABOSA COM POTENCIAL CICATRIZANTE

PONTA GROSSA
2021

RAYZA ASSIS DE ANDRADE

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO CONTENDO GEL DE
BABOSA COM POTENCIAL CICATRIZANTE

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

2021

A553 Andrade, Rayza Assis de
Desenvolvimento de hidrogéis de alginato contendo gel de babosa com
potencial cicatrizante / Rayza Assis de Andrade. Ponta Grossa, 2021.
56 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira.

1. Curativo. 2. Cicatrização. 3. Lesão cutânea. 4. Fitoterápico. 5. Aloe vera.
I. Pereira, Airton Vicente. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia
Celular e Molecular. III.T.

CDD: 574.192



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



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 07/2021, DA MESTRANDA RAYZA ASSIS DE ANDRADE, REALIZADA NO DIA 03 DE SETEMBRO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos três dias de Setembro de dois mil e vinte e um, às 9h00min, em conformidade com o Art.2º da portaria CAPES n. 36 de 19 de março de 2020, através de videoconferência pelo Google Meet, em seção pública, 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 **Rayza Assis de Andrade** na linha de pesquisa: Pesquisa de compostos com atividade biológica, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Profa Dra Carla Cristine Kanunfre (UEPG/PR) e Profa Dra Daniela Gaspardo Folquitto (CESCAGE/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 de hidrogéis de alginato contendo gel de babosa com potencial cicatrizante”**. 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 Carla Cristine Kanunfre (DEBIO - UEPG) – Titular

Profa Dra Daniela Gaspardo Folquitto (CESCAGE/PR) – Titular

Ponta Grossa, 03 de setembro de 2021.

Dedico este trabalho a Deus, por ter me confortado e dado forças do primeiro ao último dia desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e oportunidade de iniciar e concluir este projeto.

À minha família pelo apoio e paciência, nunca deixando de incentivar e apoiar. Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, pela dedicação, inspiração e resiliência.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela possibilidade de realizar este trabalho.

Aos companheiros de turma, em especial a Sol, Dani e Kelly pela companhia, amizade e entusiasmo.

À Professora Dra. Patrícia Mazureki Campos pelo companheirismo, carinho e apoio e pelas contribuições na banca de qualificação.

À Professora Dra. Danielle Kalva pela participação na banca de qualificação, e por todos os apontamentos na finalização do trabalho.

À Professora Dra. Carla Kanunfre e à doutoranda e excepcional pesquisadora, Luiza pela parceria no desenvolvimento dos testes, pelos ensinamentos e pela gentileza em compartilhar os insumos necessários para desenvolvimento dos ensaios.

À Traudi e à Lucia pelo empréstimo dos laboratórios, pela companhia e por todo conhecimento compartilhado durante a fase inicial dos estudos.

Em especial ao Professor Airton, pela dedicação, companheirismo, paciência e sabedoria. Ser orientador é uma árdua missão, mas, ser orientador em meio a crises de ansiedade, desespero e pandemia ainda é muito desafiador, agradeço a sua coragem e profissionalismo, minha gratidão eterna.

“Não tenham medo de sonhar coisas grandes”
Papa Francisco

RESUMO

O tratamento de feridas crônicas é um processo altamente dinâmico e variável. Há diversos tipos de curativos para o tratamento de lesões crônicas. O alginato é um biopolímero extraído de algas marrons e amplamente utilizado na confecção de curativos. Os hidrogéis de alginato absorvem água e mantêm a ferida úmida, propiciando um ambiente adequado para crescimento e proliferação celular. O efeito cicatrizante do alginato pode ser potencializado por compostos de origem natural. Entretanto, não há curativos de alginato contendo extratos de plantas medicinais com efeito cicatrizante. *Aloe barbadensis* Mill., popularmente conhecida como babosa, possui ações anti-inflamatória e cicatrizante. O objetivo do presente estudo foi obter e caracterizar as propriedades físico-químicas de hidrogéis de alginato contendo gel de babosa e avaliar o efeito cicatrizante *in vitro*. As formulações foram submetidas a avaliação do pH, viscosidade, densidade relativa, espalhabilidade, características organolépticas e ensaio de estabilidade acelerada. Uma formulação de hidrogel de alginato contendo gel de babosa com melhor perfil para o uso tópico foi selecionada para ensaios *in vitro*: viabilidade celular, pelos métodos de MTT e SRB; e migração celular, pelo método *Scratch*, utilizando uma linhagem de fibroblastos. Os ensaios físico-químicos evidenciaram que as formulações são estáveis e possuem pH compatível com a pele. Os valores de espalhabilidade e viscosidade variaram de acordo com a composição polimérica das formulações. No ensaio *in vitro* de viabilidade celular, observou-se que a morfologia celular não foi alterada, assim como a viabilidade e a capacidade de multiplicação das células. No ensaio *in vitro* de migração celular, quando comparada ao controle, a formulação com gel de babosa acelerou o processo de migração celular. Os resultados confirmaram a possibilidade de incorporar gel de babosa em hidrogéis de alginato obtendo formulações estáveis e adequadas ao uso tópico com potencial emprego como cicatrizante de feridas.

Palavras-chave: Curativo. Cicatrização. Lesão cutânea. Fitoterápico. *Aloe vera*. Ferida. Pele.

ABSTRACT

The treatment of chronic wounds is a highly dynamic and variable process. There are several types of curatives for the treatment of chronic. Alginate is a biopolymer extracted from brown algae that is widely used in the manufacture of wound dressings. Alginate hydrogels absorb water and keep the wound moist, providing a suitable environment for cell growth and proliferation. The healing effect of alginate can be enhanced by natural compounds. However, there are no alginate dressings containing medicinal plant extracts with a healing effect. *Aloe barbadensis* Mill., popularly known as aloe vera, has anti-inflammatory and healing actions. The aim of the present study was to obtain and characterize the physicochemical properties of alginate hydrogels containing aloe vera gel and evaluate the *in vitro* healing effect. The formulations were submitted to evaluation of pH, viscosity, relative density, spreadability, organoleptic characteristics and accelerated stability test. An alginate hydrogel formulation containing aloe vera gel with the best profile for topical use was selected for *in vitro* assays: cell viability by MTT and SRB methods and cell migration by Scratch assay, using fibroblasts cells. The physical-chemical tests showed that the formulations are stable and have a pH compatible with the skin. The spreadability and viscosity values varied according to the polymeric composition of the formulations. In the *in vitro* cell viability assay, it was observed that the cell morphology was not altered, as well as viability and multiplication capacity of the cells. In the *in vitro* cell migration assay, when compared to the control, the formulation with aloe gel accelerated the cell migration process. The results confirmed the possibility of incorporating aloe vera gel in alginate hydrogels, obtaining stable formulations suitable for topical use with potential as wound healing materials.

Keywords: Curative. Healing. Skin lesion. Phytotherapeutic. *Aloe vera*. Wound. Skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da pele.....	17
Figura 2 – Estruturas de resíduos de alginato.....	21
Figura 3 – Espécie <i>Aloe barbadensis</i> Mill.	23
Figura 4 – Folhas e gel de <i>Aloe barbadensis</i> Mill.	24
Figura 5 - Extração do gel de babosa	27
Figura 6 – Traçado no papel milimetrado utilizado no teste de espalhabilidade	29
Figura 7 – Amostra de hidrogel aplicada na lâmina de vidro para análise de espalhabilidade	30
Figura 8 – Aspecto plástico do hidrogel após aplicação na pele.....	36
Figura 9 – ph médio de formulações de hidrogel alginato-babosa sob diferentes condições de armazenamento	39
Figura 10 – Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com formulação de hidrogel contendo gel de babosa por MTT	45
Figura 11 – Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com formulação de hidrogel contendo gel de babosa por SRB	46
Figura 12 – Morfologia das células 3T3 durante o ensaio de migração celular	47
Figura 13 – Taxa de cicatrização obtida na análise de migração celular	48
Figura 14 – Processo de fechamento da lesão após 24 h de teste de migração celular	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações de hidrogéis.....	37
Tabela 2 - Densidade relativa de hidrogéis contendo gel de babosa mantidos à temperatura ambiente.....	38
Tabela 3 - Viscosidade aparente (Pa/s) de hidrogéis contendo gel de babosa armazenados sob diferentes condições	41
Tabela 4 - Espalhabilidade média de hidrogéis alginato-babosa armazenados sob diferentes condições.....	42
Tabela 5 - Características organolépticas de formulações armazenadas à temperatura ambiente com exposição à luz.....	43
Tabela 6 - Análise de características organolépticas de formulações armazenadas sob refrigeração.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CMC	Carboximetilcelulose
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Grama
h	Horas
L	Litro
M	Molar
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
Nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SRB	Sulforodamina B
Pa	Pascal
pH	Potencial hidrogeniônico
µg	Micrograma
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UV/Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1	PELE.....	17
3.2	LESÕES CUTÂNEAS.....	18
3.3	HIDROGÉIS NO TRATAMENTO DE FERIDAS.....	20
3.3.1	Alginate.....	20
3.3.2	<i>Aloe barbadensis</i> Mill.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	26
4.2	EXTRAÇÃO DO GEL DE BABOSA.....	26
4.3	FORMULAÇÕES DOS HIDROGÉIS.....	27
4.4	TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO.....	28
4.5	DENSIDADE RELATIVA.....	28
4.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	28
4.6.1	Estudos de Estabilidade Acelerada.....	28
4.6.1.1	Determinação do pH.....	29
4.6.1.2	Viscosidade.....	29
4.6.1.3	Espalhabilidade.....	29
4.6.1.4	Análise de Características Organolépticas.....	31
4.7	AVALIAÇÃO IN VITRO.....	31
4.7.1	Linhagem Celular.....	31
4.7.2	Ensaio de Viabilidade Celular por MTT.....	31
4.7.3	Avaliação da Viabilidade Celular por Coloração de Proteínas (Sulforodamina B (SRB))	32
4.7.4	Ensaio de Migração Celular (Método Scratch).....	33
4.7.5	Análise Estatística.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO.....	35
5.2	TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO.....	37

5.3	DENSIDADE RELATIVA.....	37
5.4	ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	38
5.4.1	Determinação do pH.....	38
5.4.2	Viscosidade.....	40
5.4.3	Espalhabilidade.....	41
5.4.4	Análise de Características Organolépticas.....	43
5.5	AVALIAÇÃO IN VITRO.....	44
5.5.1	Avaliação da Viabilidade Celular	44
5.5.2	Ensaio de Migração Celular.....	46
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A pele desempenha um papel importante na manutenção da homeostase fisiológica, exercendo várias funções importantes para o corpo humano como, por exemplo, proteção contra os efeitos do meio ambiente, incluindo danos causados pelo sol, prevenção de perda de água, proteção contra infecção, regulação da temperatura corporal e proteção mecânica contra traumas (DEALEY, 2009; SORG *et al.*, 2016).

Devido às funções vitais como barreira física, química e bacteriana, a cicatrização é um passo importante para a recuperação da integridade da pele frente às lesões. Apesar do conhecimento atual sobre a cura de lesões, ainda há muitas questões a serem discutidas e mecanismos a serem elucidados (SORG *et al.*, 2016). O processo de cicatrização de lesões cutâneas é bastante complexo e dependente de uma interação intrincada entre vários fatores altamente regulados, operando em conjunto para restaurar a integridade da pele lesada. Uma sequência de eventos que compreende as fases de coagulação, inflamatória (recrutamento de leucócitos), proliferativa (deposição da matriz extracelular) e de remodelação (epitelização) ocorrem normalmente na maioria das lesões superficiais (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A evolução das fases da cicatrização é o principal fator considerado na escolha do tratamento de lesões cutâneas. Quando a cicatrização de uma lesão não progride de forma natural, afetado por fatores locais e sistêmicos, essas etapas podem não evoluir como esperado e a lesão tornar-se crônica. Dentre os fatores locais, pode-se destacar a infecção como a causa mais comum de retardo do processo de cicatrização. E com relação aos fatores sistêmicos, como idade, faixa etária, estado nutricional, doenças crônicas associadas, insuficiências vasculares, úlceras e o uso de medicamentos anti-inflamatórios (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Dentre as lesões crônicas estão o pé diabético, as úlceras de pressão e as úlceras venosas. Nesses casos, o tratamento deve ser individualizado e realizado por profissionais habilitados. O pé diabético é a principal causa de internação de pacientes diabéticos, já as úlceras de pressão são uma condição dolorosa e debilitante, causando uma interrupção considerável no progresso do paciente e comprometendo uma grande parte dos recursos de saúde (DEALEY, 2009).

Um dos aspectos mais difíceis da pesquisa sobre lesões por pressão é a determinação de critérios precisos de avaliação clínica. A longo prazo, tais lesões

acabam interferindo nos índices de morbidade e mortalidade, por produzirem alterações crônicas na pele, ocasionando incapacitação e/ou amputação de membros (OLIVEIRA; SOARES; ROCHA, 2010; OLSHANSKY, 2019).

Úlceras venosas são as lesões mais graves na Síndrome da Insuficiência Venosa Crônica dos membros inferiores, sendo caracterizada como um problema de saúde pública, uma vez que o quadro clínico afeta a qualidade de vida do paciente, pois acarreta limitação em atividades cotidianas e, na maioria das vezes, reclusão social (JOAQUIM *et al.*, 2018).

O tratamento de lesões é um processo altamente dinâmico e variável. Os curativos são uma forma de tratamento das feridas cutâneas e sua escolha depende de diversos fatores, em especial da evolução das fases de cicatrização. Embora haja uma grande variedade de curativos, um só tipo de curativo não preenche os requisitos para ser aplicado em todos os tipos de feridas cutâneas. Atualmente há inúmeras opções de curativos no mercado. Os recursos financeiros do paciente ou da unidade de saúde, a frequência de trocas dos curativos, inclusive com visitas domiciliares, e a avaliação do custo-benefício são alguns dos aspectos a serem considerados na escolha do tipo de curativo (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

A compatibilidade das propriedades físicas e químicas do curativo com a natureza da ferida devem ser levadas em consideração no planejamento de um produto cicatrizante (MIR *et al.*, 2018).

Diversos biopolímeros como alginato, quitosana, pectina e gelatina são usadas na fabricação de curativos. Os curativos de alginato de sódio ou cálcio permitem a incorporação de compostos naturais que podem apresentar efeito sinérgico no processo de cicatrização (KOGA, 2017).

O uso de plantas medicinais, tanto no contexto dos fitoterápicos quanto de fitofármacos, tem grande influência na busca por tratamentos eficazes na cicatrização de feridas. Dentre as espécies mais relatadas e testadas quanto à atividade cicatrizante, destacam-se a calêndula, o barbatimão, a copaíba e a babosa (RAMALHO *et al.*, 2018).

A espécie *Aloe barbadensis* Mill., sinônimo de *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, é pertencente ao gênero *Aloe*, que possui mais de 1000 espécies (THE PLANT LIST, 2019). Outras atividades biológicas são atribuídas à esta espécie, sendo também recomendada no tratamento da psoríase, herpes genital,

hiperglicemia e queimaduras. As atividades antineoplásica, antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomodulatória também foram demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo* (FREITAS-BLANCO; RODRIGUES; GASPI, 2014).

Pereira, Mendes e Bártolo (2013) avaliaram as características físicas de filmes contendo alginato/*Aloe vera* para aplicação como curativo em feridas cutâneas e seus resultados mostraram que o comportamento dos filmes depende da quantidade de babosa. Os autores sugerem que os filmes de alginato podem ser potencialmente explorados como curativo para feridas secas e exsudativas.

Koga *et al.* (2018) desenvolveram um curativo de alginato com gel de *Aloe barbadensis* Mill. e avaliaram o efeito cicatrizante *in vivo*. A caracterização físico-química demonstrou que o filme alginato-Aloe tem as características adequadas para o uso como curativo e os resultados do ensaio de cicatrização *in vivo*, demonstrando que o filme alginato-Aloe apresentava os requisitos e o potencial para a aplicação como curativo de lesões cutâneas.

Oryan *et al.* (2019) avaliaram um hidrogel de Aloe carregado com células-tronco derivadas de adiposidade para promover o efeito curativo de modelos de queimaduras em ratos e confirmaram que o hidrogel de Aloe pode promover significativamente a cicatrização de feridas por queimaduras.

Sabe-se que alguns curativos apresentam algumas desvantagens no uso em feridas cutâneas, como: lesar a pele quando não retirado adequadamente, não absorção de exsudato, não aderência total em determinadas regiões do corpo (especialmente região sacral) ou em peles oleosas e não serem indicados na presença de infecções (CALIRI *et al.*, 2013).

Hidrogéis de alginato são formulações de fácil aplicação em feridas e não causam trauma quando removidos, favorecendo a adesão ao tratamento. Podem ser usados em feridas infectadas, queimaduras e úlceras superficiais e profundas. Considerando-se a hipótese de se potencializar o efeito cicatrizante do alginato pela incorporação de extratos de plantas medicinais, nesse trabalho apresentamos o desenvolvimento, a caracterização físico-química, a avaliação sobre viabilidade celular e o efeito cicatrizante *in vitro* de um hidrogel de alginato contendo gel de babosa.

1 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter hidrogéis de alginato contendo gel de babosa e avaliar o potencial efeito cicatrizante *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

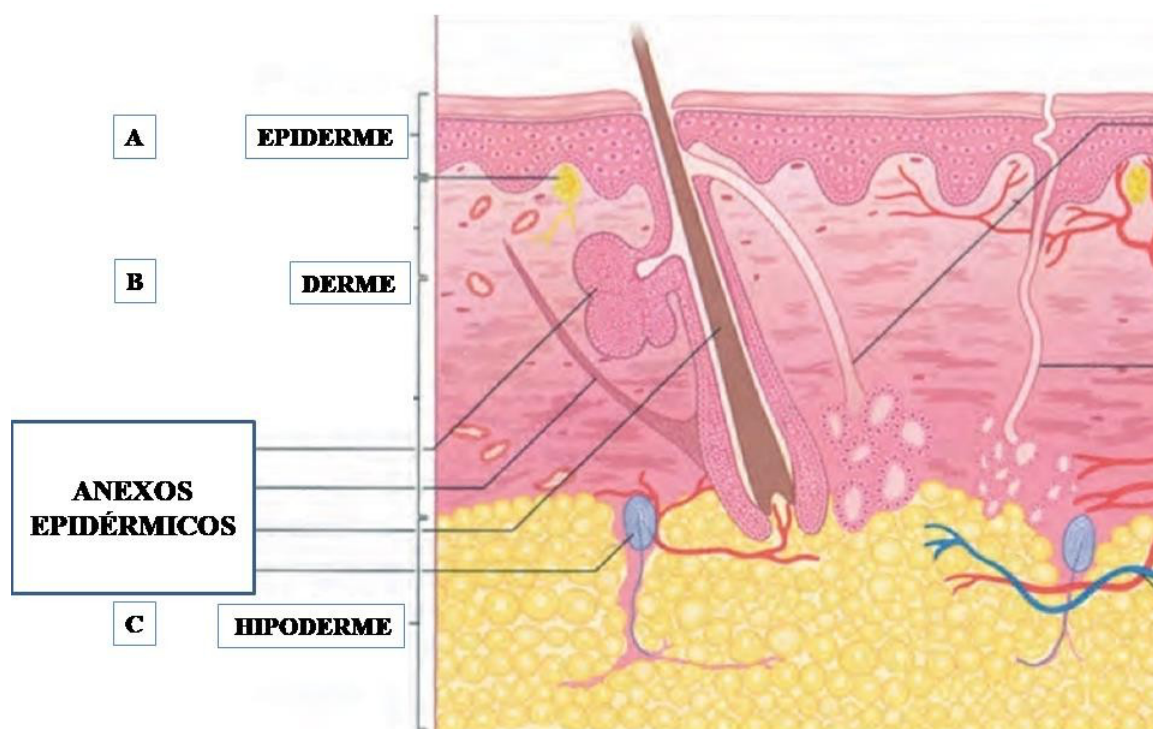
- Obter, avaliar as propriedades físico-químicas e a estabilidade de hidrogéis de alginato-babosa;
- Determinar o efeito do hidrogel alginato-babosa sobre a viabilidade celular em cultura de fibroblastos 3T3 pelos testes com MTT e sulforrodamina B;
- Avaliar o efeito do hidrogel alginato-babosa sobre a migração celular de fibroblastos 3T3 pelo método *scratch assay*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15 % do peso corporal e sendo responsável pela realização de diversas funções vitais, como: proteção contra agressores físicos, químicos e biológicos externos; prevenção da perda de água corporal e com um importante papel na termorregulação. A pele é composta por duas camadas: a epiderme e a derme, com diversos graus de especialização em cada uma das camadas. E, o tecido subcutâneo localizado abaixo da derme, é denominado hipoderme (Figura 1) (KANITAKIS, 2002; WONG *et al.*, 2015).

Figura 1 – Estrutura da pele



Fonte: Adaptado de KOLARSICK, P.A.; KOLARSICK, M.A.; GOODWIN, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 3, 203-213.

A epiderme corresponde à camada mais externa da pele e atua como uma barreira física contra patógenos, irradiação e toxinas prejudiciais à saúde. A função de barreira da pele se dá principalmente pela constante renovação de suas camadas,

em especial a camada cornificada mais externa: o estrato córneo (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; MORIYAMA *et al.*, 2016).

A derme compreende a maior parte da pele, tendo o colágeno como principal componente. Pode-se definir a derme como um sistema integrado de tecido conjuntivo fibroso, filamentoso e amorfo que acomoda as redes do sistema nervoso e vasculares, os apêndices derivados da epiderme, fibroblastos, macrófagos e mastócitos (PROST-SQUARCIONI *et al.*, 2008).

Apesar de não ser considerada uma das camadas da pele, a hipoderme, conhecida como tecido subcutâneo, é formada por gordura e atua como uma reserva de energia para o corpo. Em sua constituição, além do tecido adiposo, apresenta fibroblastos, tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e macrófagos. O panículo adiposo (camada de adipócitos) varia em espessura dependendo do local da pele (CUNHA *et al.*, 2017; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; STECCO *et al.*, 2015).

3.2 LESÕES CUTÂNEAS

Traumas cutâneos, comumente chamados de feridas, são definidos principalmente como lesão e/ou ruptura na superfície da pele, causados por traumas físicos ou térmicos, os quais resultam em inúmeros eventos celulares e moleculares até sua cicatrização (GONZALEZ *et al.*, 2016).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve vários estágios sequenciais, os quais incluem: inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização, formação de matriz, remodelação e recuperação de tecido (BARRIENTOS *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2016).

Os principais eventos de sinalização celular e atividades da matriz extracelular no processo de cura são controlados por fatores de crescimento, incluindo: fatores de crescimento fibroblástico (FGFs), fatores de crescimento epidérmico (EGFs), fatores de crescimento transformadores (TGFs) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) (CHABLAIS; JAZWINSKA, 2010; WERNER; GROSE, 2003).

Após a lesão, a barreira epidérmica é rompida e os queratinócitos liberam interleucina-1 pré-armazenada (IL-1), correspondente ao primeiro sinal de alerta às células circundantes sobre danos à barreira. Além disso, os componentes do sangue são liberados no local da ferida, ativando a cascata de coagulação e fornecendo uma

matriz para o influxo de células inflamatórias. A degranulação plaquetária libera os grânulos alfa secretores de fatores de crescimento que, juntamente com citocinas pró-inflamatórias, são importantes no direcionamento de neutrófilos ao local da ferida, para remoção de bactérias contaminantes. Com a ajuda do TGF- β , os monócitos são convertidos em macrófagos, desempenhando papel importante no aumento da resposta inflamatória e no desbridamento do tecido. Os macrófagos iniciam o desenvolvimento do tecido de granulação e liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Resumidamente, a melhora e a cura de feridas ocorrem por meio de um mecanismo complexo, regulado e avançado (ZHAO *et al.*, 2016). Inicialmente, a ruptura da pele criada no local da ferida é fechada rapidamente e o epitélio é reestabelecido na superfície da ferida. No entanto, se o mecanismo de cicatrização for interrompido por qualquer motivo, a tendência de cicatrização é afetada. O tamanho da ferida; armazenamento de sangue no local; contaminação por microrganismos; idade, estado de saúde e estado nutricional do paciente; são fatores que determinam o tipo e auxiliam na classificação das feridas em dois grupos distintos, sendo elas: feridas agudas e feridas crônicas (GONZALEZ *et al.*, 2016).

As feridas agudas geralmente são superficiais e são completamente curadas em um período de 8 a 12 semanas, enquanto que as feridas crônicas são consideradas um grupo de feridas mais grave, curadas lentamente, necessitando de um período maior para sua cicatrização, pois são rupturas graves na barreira cutânea que não cicatrizam em um período de tempo aceitável, o que impede a restauração completa da integridade anatômica e funcional do tecido, aumentando a probabilidade de infecções e apoptose (HASHEMI; MADANI; ABEDIANKENARI, 2015).

Cicatrizações tardias e evolução do quadro para ferida crônica são partes das principais questões terapêuticas e econômicas na medicina atual. As feridas tornam-se crônicas se não passarem por todas as fases da cicatrização. Pacientes com feridas crônicas frequentemente sofrem de outras comorbidades, sendo raramente observadas em indivíduos saudáveis (GYLES *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; SEN *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2016).

3.3 HIDROGÉIS NO TRATAMENTO DE FERIDAS

Os hidrogéis são formulações que fornecem um ambiente úmido capaz de proporcionar uma rápida granulação e reepitelização da área da ferida, acelerando o processo de cicatrização. Os sistemas de redes hidrofílicas também apresentam potencial para mimetizar os tecidos biológicos, o que auxilia em sua aplicação biomédica. Adicionalmente, devido à presença de moléculas hidrofílicas, permite a absorção de até 90 % do seu peso em fluidos (GYLES *et al.*, 2020; O'DONOGHUE *et al.*, 1997).

Devido à compatibilidade com a pele, os hidrogéis de polímeros naturais vêm sendo muito estudados e utilizados como curativos (ABASALIZADEH *et al.*, 2020). São formas farmacêuticas preferidas aos cremes devido ao alto teor de água que auxilia na redução da dor na aplicação, particularmente, nas membranas mucosas e na pele lesionada (HENRIQUES *et al.*, 2006).

Diversos polímeros são utilizados para a preparação dos hidrogéis e os polissacarídeos têm estado em foco na área farmacêutica, sendo considerados materiais promissores ao desenvolvimento de curativos, entre os quais, a quitosana e o alginato têm-se destacado devido às suas propriedades bioativas, hemostáticas e bacteriostáticas (ABASALIZADEH *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2016).

Os hidrogéis são materiais de alto teor de água, preparados a partir de polímeros reticulados que são capazes de fornecer uma variedade de agentes terapêuticos, além de um ambiente úmido e boa absorção de fluidos, acelerando o processo de cicatrização de feridas (COOPER; MOLAN; HARDING; 1999).

Hidrogéis têm várias propriedades favoráveis comparado às pomadas quando destinados ao uso dermatológico. São hidratantes, tixotrópicos e não gordurosos, possuem fácil espalhabilidade e remoção, não mancham, são compatíveis com diversos excipientes e solúveis ou miscíveis em água (EL-KASED *et al.*; 2017).

3.3.1 Alginato

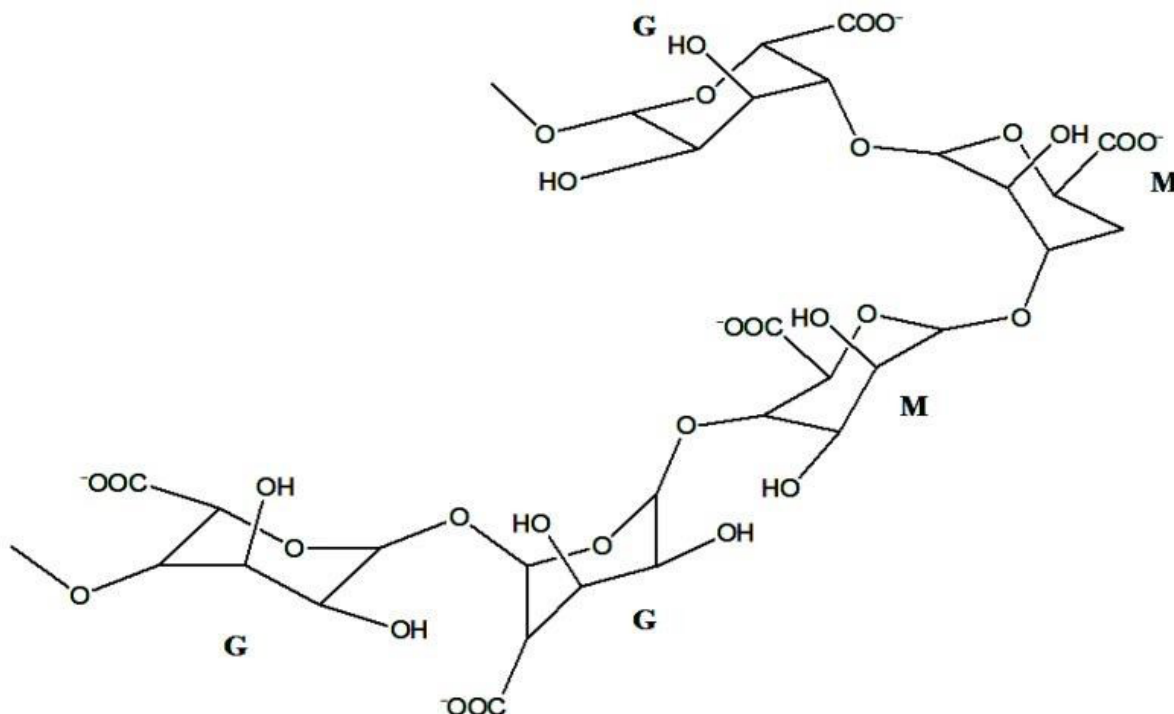
O alginato é um polissacarídeo de cadeia longa, adequado para a síntese de polímeros. É um produto de origem natural, extraído de algas marrons. Destaca-se devido às suas propriedades físico-químicas singulares, as quais contribuem para a sua biocompatibilidade, baixo custo, não-toxicidade celular e biodegradabilidade, tornando-o um material de transporte qualificado para diversos compostos bioativos

a fim de serem utilizados como curativos cutâneos (ABASALIZADEH *et al.*, 2020; ALAVI; RAI, 2019; KUMAR *et al.*, 2019).

É composto por um bloco de resíduos ligados de β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G). Os blocos são compostos por resíduos G consecutivos (GGGGGG) e resíduos M (MMMMMM), e resíduos M e G alternados (GMGMGM). Os alginatos contêm diferentes proporções e a sequência de resíduos M e G que determinam suas propriedades físicas e peso molecular (Figura 2) (ADERIBIGBE; BUYANA, 2018).

Sua capacidade de formar géis depende da proporção de resíduos M e G e do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. As propriedades reológicas estão associadas ao grau de polimerização, às complexas interações entre íons e os resíduos G e M e ao grau de acetilação. A força do gel formado irá depender do número e da extensão dos blocos de resíduos G ao longo da cadeia polimérica e da concentração de íons presentes. A presença de grupos acetil confere ao material características viscoelásticas mais pronunciadas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Figura 2 – Estruturas de resíduos de alginato



Fonte: ADERIBIGBE, B.A.; BUYANA, B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*. 10(2):42, 2018. Nota: M= β -D-manuronato; G= α -L-guluronato.

Os hidrogéis de alginato podem ser preparados por vários métodos de

reticulação e, sua similaridade estrutural com matrizes extracelulares de tecidos vivos, permite amplas aplicações na cicatrização de feridas, carreando agentes bioativos, como moléculas de baixa massa molecular e proteínas (LEE; MOONEY, 2012).

Sendo o hidrogel de alginato um material amplamente investigado e utilizado na área biomédica, nos últimos anos têm-se desenvolvido formulações contendo gel de *Aloe vera* para uso em tratamento de feridas cutâneas (ABASALIZADEH *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2013).

3.3.2 *Aloe barbadensis* Mill.

A espécie *Aloe barbadensis* Mill. (sinonímia de *Aloe vera*) (Figura 3) é nativa da região mediterrânea do sul da Europa, do norte da África e das Ilhas Canárias. Pertencente à família Liliaceae, cresce facilmente em regiões quentes e áridas. É amplamente distribuída na Ásia, África e outras áreas tropicais; tem formato arbustivo ou arborescente, perene, xerófita, suculenta e de cor verde.

Dentre as atividades terapêuticas, incluem-se as atividades antibacteriana, antiviral, anticâncer, bem como propriedades imunorreguladora, hepatoprotetora e cicatrizante (KUOK *et al.*, 2019; MORIYAMA *et al.*, 2016; SURJUSHE; VASANI; SAPLE, 2008).

Figura 3 – Espécie *Aloe barbadensis* Mill.



Fonte: A autora.

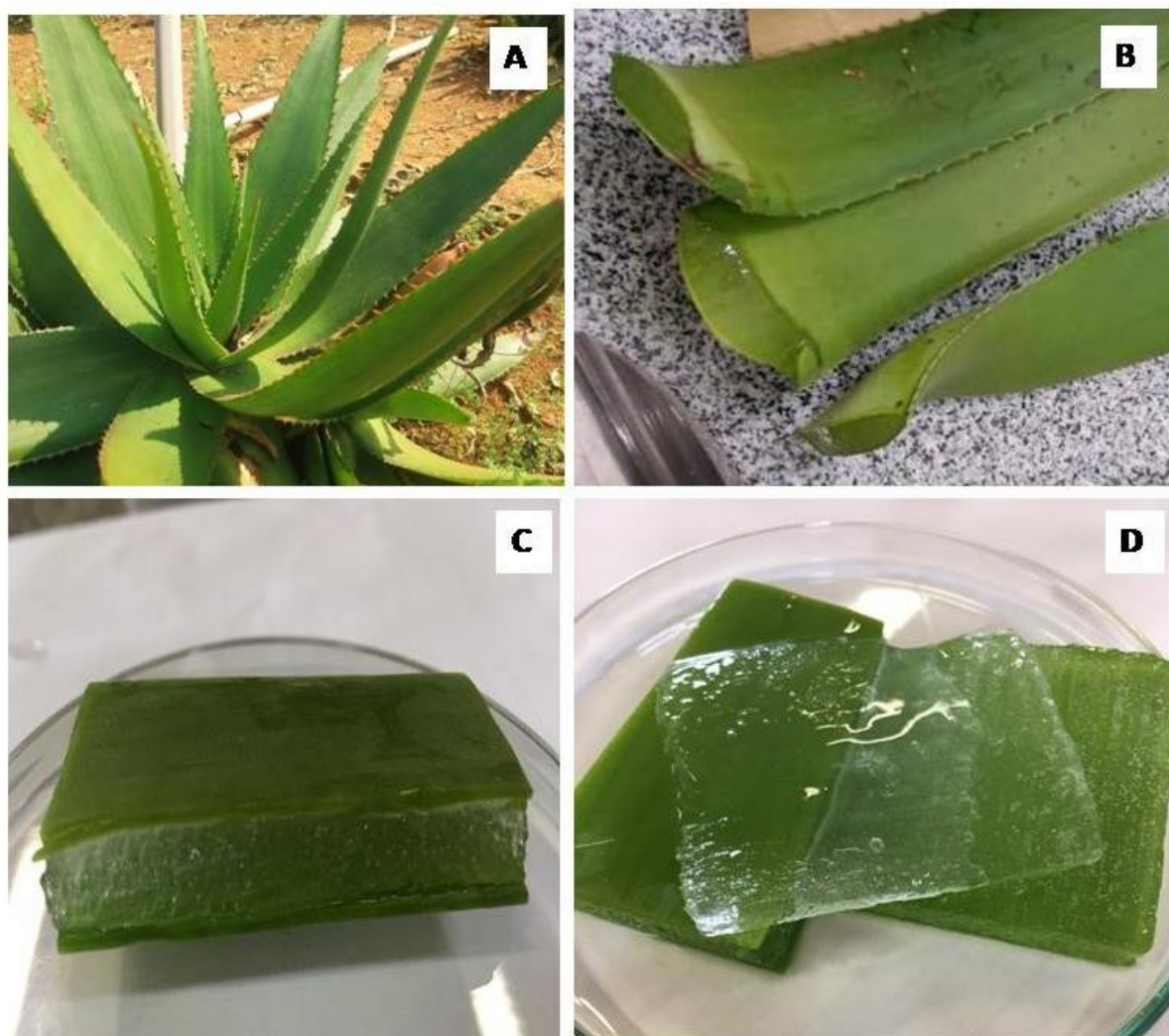
Possui folhas carnudas, triangulares, com bordas serrilhadas, flores tubulares de cor laranja e frutos que contêm numerosas sementes. Cada folha é composta por três camadas (SURJUSHE; VASANI; SAPLE, 2008) conforme descrito abaixo:

- a) Gel interno, transparente, que contém 99% de água e os demais componentes são glucomananas, aminoácidos, lipídios, esteróis e vitaminas;
- b) Camada intermediária, composta por seiva de cor amarelada e sabor amargo, a qual contém antraquinonas e glicosídeos;
- c) Camada externa, espessa, com 15 a 20 células, denominada de “casca”, que possui função de proteção e síntese de carboidratos e

proteínas.

O tecido de mucilagem, também conhecido como gel, está presente no centro das folhas (Figura 4) e possui diversos compostos, como flavonoides, terpenoides, antraquinonas, taninos e saponinas; os quais contribuem para sua utilização tanto para fins cosméticos quanto para aplicações médicas. Devido à alta demanda, a espécie é cultivada em grandes quantidades e o gel é o produto de maior valor agregado (GYLES *et al.*, 2020; HASHEMI; MADANI; ABEDIANKENARI, 2015; ORYAN *et al.*, 2019; PEREIRA; BÁRTOLO, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2020).

Figura 4 – Folhas e gel de *Aloe barbadensis* Mill.



Fonte: A autora.

Nota: A=Aloe barbadensis; B= Folha coletada; C= secção transversal da folha; D= gel extraído.

A espécie *Aloe barbandesis* contém 75 constituintes potencialmente ativos: vitaminas (A, C e E; que são antioxidantes; B12, ácido fólico e colina), enzimas (por

exemplo, a bradiginase, a qual reduz inflamação na pele), minerais, açúcares, lignina (quando incluída em preparações tópicas aumenta o efeito de penetração dos outros ativos na pele), saponinas (com potencial de formação de gel a 3%, com propriedades antissépticas), ácidos salicílicos (propriedades anti-inflamatória e antibacteriana) e aminoácidos. O uso clínico é apoiado, principalmente, pelo conhecimento popular como, por exemplo, contra alopecia, infecções bacterianas e fúngicas, feridas crônicas, infecções parasitárias, lúpus e artrite (SURJUSHE; VASANI; SAPLE, 2008). Apesar dos efeitos terapêuticos amplamente descritos e consagrados da espécie *Aloe barbadensis* Mill., não há formulações comerciais contendo o gel destinadas ao uso como curativo de feridas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Folhas frescas de *Aloe barbadensis* Mill. foram coletadas no Horto Medicinal do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas (25°5'23" S, 50°6'23" W), em Ponta Grossa, Paraná, Brasil. A espécie vegetal foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob número de registro 22131. Para obtenção de um maior volume de mucilagem foram selecionadas e utilizadas folhas adultas.

4.2 EXTRAÇÃO DO GEL DE BABOSA

As folhas foram higienizadas e seccionadas longitudinalmente, sendo que as extremidades e margens das folhas foram descartadas. Após, as folhas foram filetadas manualmente de forma cuidadosa para a remoção do parênquima clorofiliano (casca) e extração do gel (Figura 5).

Posteriormente, o gel foi homogeneizado e armazenados em recipiente herméticos e mantido em temperatura de -5 ± 2 °C. O processo de degelo à temperatura ambiente foi realizado apenas no momento do uso.

Figura 5 - Extração do gel de babosa



Fonte: A autora.

4.3 FORMULAÇÕES DOS HIDROGÉIS

Foram preparadas 06 formulações de hidrogel utilizando alginato de sódio, carboximetilcelulose sódica (CMC), gel de babosa, glicerina e conservantes. Inicialmente, os conservantes imidazolinidilureia (0,2 %) e benzoato de sódio (0,1 %) foram dissolvidos em água ultrapura, seguidos do alginato de sódio (1 a 2 %) e CMC (1 a 2 %), sob agitação vigorosa até completa dissolução e homogeneização. Na sequência, adicionou-se glicerina (5 %), sob agitação constante. Por fim, o gel de babosa (5 a 20 %) foi incorporado ao hidrogel de alginato com agitação branda, utilizando agitador mecânico de hélice.

4.4 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO

O procedimento foi realizado conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004). No procedimento, foram adicionados 10 g de amostra em tubos do tipo Falcon, seguido de centrifugação a 3000 rpm, durante 30 minutos, as amostras foram testadas em triplicata. Após a centrifugação, foi feita a análise visual do aspecto da formulação.

4.5 DENSIDADE RELATIVA

Para a determinação da densidade relativa (Equação 1), utilizou-se uma proveta de vidro de 10 mL, limpa e seca. A massa da proveta vazia foi determinada. A seguir, o volume foi completado com água deionizada ou amostra e a massas determinadas em balança analítica. O volume na precisão foi correspondente a 0,1 mL. A análise foi realizada à temperatura ambiente (25 °C), para as diferentes amostras.

$$dr = dx / dy \quad (1)$$

Em que:

dr = densidade relativa

dx= densidade da formulação dy= densidade da água

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE

4.6.1 Estudos de Estabilidade Acelerada

As formulações foram submetidas a armazenamento sob diferentes temperaturas, sendo: 5 ± 2 °C (refrigerador); 25 ± 2 °C (temperatura ambiente); 25 ± 2 °C (temperatura ambiente com exposição à luz), e 45 ± 2 °C (estufa) por 60 dias. Neste ensaio, as amostras foram armazenadas em tubos de vidro transparente, tampadas, mantendo-se um *head space* de aproximadamente um terço de capacidade do frasco, permitindo possíveis trocas gasosas, conforme orientação do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004). As análises de pH,

densidade, espalhabilidade, viscosidade e de características organolépticas foram realizadas em triplicata, após o preparo (tempo 0) e, depois de 7, 14, 21, 28 e 60 dias.

4.6.1.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada diretamente nas formulações (diluição 1:10 com água destilada), utilizando um potenciômetro digital previamente calibrado, com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 à temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos em triplicata.

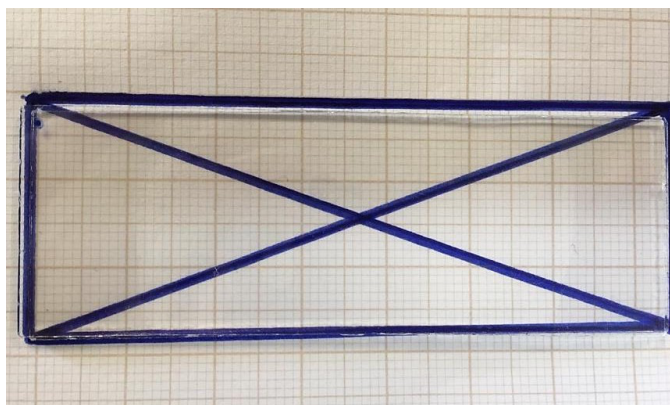
4.6.1.2 Viscosidade

A viscosidade aparente foi determinada à temperatura ambiente (25 °C), em triplicata, utilizando um viscosímetro de *Brookfield* (QuimisQ860M), *spindle* número 4 e velocidade de 6 rpm. Os resultados são expressos em Pa/s.

4.6.1.3 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Knorst (1991), com modificações. As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C). Papel milimetrado foi utilizado como base. Para tanto, traçou-se as linhas laterais de uma lâmina de vidro para microscopia e delimitou-se as diagonais, formando-se assim, um ponto central (Figura 6).

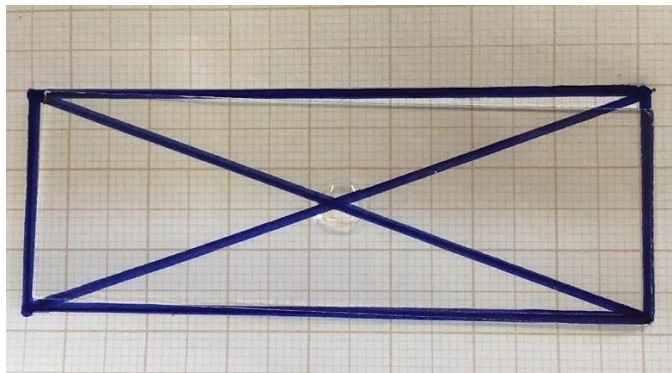
Figura 6 – Traçado no papel milimetrado utilizado no teste de espalhabilidade



Fonte: A autora.

Aplicou-se 50 mg de amostra na lâmina, posicionando sob a área de intersecção das diagonais desenhadas previamente (Figura 7). Na sequência, outra lâmina de vidro, com massa conhecida foi suavemente posicionada sob a primeira lâmina contendo a amostra. Após 1 minuto, anotou-se o raio médio do círculo formado pelo espalhamento da amostra.

Figura 7 – Amostra de hidrogel aplicada na lâmina de vidro para análise de espalhabilidade



Fonte: A autora.

A determinação da espalhabilidade foi realizada com todas as amostras, mantidas nas diferentes condições de temperatura de armazenamento, a fim de verificar a influência sobre a espalhabilidade da amostra. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado.

O mesmo procedimento foi seguido, sempre com intervalos de 1 minuto, adicionando-se lâminas com massas determinadas. As análises de espalhabilidade foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado. A determinação da espalhabilidade foi designada pela equação:

$$E_i = (d^2 \times \pi) \quad (2)$$

Em que:

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

d = diâmetro médio (mm)

4.6.1.4 Análise de Características Organolépticas

Foram avaliados nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias, as seguintes características organolépticas referentes a formulação:

- a) Cor;
- b) Integridade da formulação (separação de fases);
- c) Aspecto;
- d) Presença de partículas;
- e) Odor.

As análises foram descritas em escala de 0 a 2, como uma formulação: (0) sem alterações; (1) com leve alteração; (2) alterada.

4.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

4.7.1 Linhagem Celular

Foram utilizadas células de fibroblasto murino (linhagem 3T3 – ATCC CRL-1658). As culturas celulares foram mantidas por expansão contínua em meio DMEM[®] suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 mL de antibiótico (penicilina - 100 U/mL e estreptomicina – 10 mg/mL) em estufa a 37 °C com atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

4.7.2 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT

Foram semeadas 3×10^3 células/poço, em placas de 96 poços, por um período de 24 horas. Posteriormente, o meio de cada poço foi removido e substituído por meio de cultura completo com adição de diferentes concentrações (de 0 a 10000 µg/mL) da formulação A contendo gel de babosa. O tempo de tratamento realizado foi de 24 horas.

Antes da adição do MTT, todos os poços foram analisados em microscópio invertido para visualização da morfologia celular, para posterior comparação com dados obtidos no MTT.

Para a leitura, o meio foi descartado e substituído pelo reagente MTT (5

mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C, por um período de 2 horas. Os cristais de formazan, resultantes da reação de MTT, foram solubilizados em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi quantificada a 570 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. O veículo apresentou células incubadas com meio + formulação sem adição do gel de babosa e o controle negativo foi preparado com as células incubadas apenas com o meio de cultivo. Todas as amostras foram testadas em triplicata. As absorbâncias obtidas foram transformadas em % de viabilidade celular de acordo com a equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \left(\frac{\text{Abs t}}{\text{Abs } \Delta \text{ cn}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sendo que:

Abs t = absorbância do poço tratado

Abs Δ cn = absorbância média controle negativo

4.7.3 Avaliação da Viabilidade Celular por Coloração de Proteínas (Sulforodamina B (SRB))

Foram semeados 3×10^3 células/poço, em placas de 96 poços, por um período de 24 horas. Posteriormente, o meio de cada poço foi removido e substituído por meio de cultura completo contendo diferentes concentrações da formulação A contendo gel de babosa (de 0 a 10000 µg/mL). O tempo de tratamento realizado foi de 24 horas.

Após o tempo de tratamento, o conteúdo da placa foi removido e lavado com 200 µL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 150 µL de ácido tricloroacético a 10 % e a placa foi mantida sob refrigeração por 30 minutos. Após, removeu-se o conteúdo da placa e esta foi lavada com 200 µL de água destilada, por 5 vezes, descartando o volume resultante.

A placa então foi seca à temperatura ambiente e, em seguida, 100 µL de solução de SRB 0,4 % (0,04 g em 10 mL) foram adicionados em cada poço e a placa mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. O reagente foi coletado e a placa lavada 5 vezes com 200 µL de ácido acético 1 %, e deixada para secar por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após secagem, 150 µL de Tribase 10 mM

foram adicionados e o conteúdo homogeneizado. A absorbância foi quantificada a 520 e 620 nm (excitação e emissão, respectivamente). O veículo foi preparado com as células incubadas com meio + formulação (sem adição do gel de babosa) e o controle negativo foi preparado com as células incubadas apenas com meio de cultivo. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

As absorbâncias obtidas foram transformadas em % de viabilidade celular de acordo com a equação apresentada no item 4.7.2.

4.7.4 Ensaio de Migração Celular (Método *Scratch*)

Para realização do teste de migração celular, foram semeadas 4×10^4 células/poço, em placas de 24 poços, cultivadas por 24 horas, até a confluência.

A monocamada de células foi riscada com uma ponta de pipeta estéril ($\varnothing = 0,1$ mm), com objetivo de produzir lesões de tamanho uniforme na camada de células. As células destacadas e os detritos foram lavados com solução de PBS.

Para testar o efeito da formulação A contendo gel de babosa na habilidade de fechamento da ferida, as monocamadas riscadas foram tratadas com a formulação e, para o controle negativo, foram utilizados o veículo (formulação sem o gel) e o meio de cultivo.

As lesões foram monitoradas de 0 a 24 h e o registro foi feito por meio de um microscópio óptico invertido equipado com uma câmera em escala de cinza. Foram observados: comportamento celular, adesão, proliferação, diferenciação e motilidade. As áreas foram medidas pelo programa ImageJ[®] e a área delimitada no programa foi exportada para realização dos cálculos. As medições de fechamento da ferida foram calculadas seguindo a equação:

$$\frac{[(At_0 - At) \times 100]}{At_0} \quad (4)$$

Sendo:

At_0 = tempo imediatamente após a lesão;

At = tempo de análise (6, 12 e 24 h).

Para as imagens que não estavam claras, o limiar foi modificado manualmente

para melhor delinear a área da lesão.

4.7.5 Análise Estatística

Os dados obtidos no ensaio de estabilidade acelerada foram submetidos a cálculos de média e desvio padrão no Excel[®], onde também foi realizada a plotagem de gráficos. Os dados das análises celulares *in vitro* foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] (versão 5.0) e expressos como média $\pm$ desvio padrão, com nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de pós-teste de Dunnett's. Para comparação entre grupos foi realizada ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

Foram necessárias três etapas para o desenvolvimento das formulações de hidrogéis com gel de babosa. Na etapa 1, foram realizados testes preliminares com formulações contendo misturas dos componentes em diferentes proporções de alginato (1 a 2%), CMC (1 a 2%) e gel de babosa (10 %). O alginato, CMC e os conservantes foram dissolvidos em água ultrapura à temperatura ambiente e misturados com auxílio de agitador em alta velocidade, até obtenção de uma solução homogênea.

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose usado como espessante que, ao absorver água, promove aumento da viscosidade. A CMC sódica é solúvel em água formando soluções transparentes. Em soluções mais concentradas, contribui para conferir a estrutura de um gel à formulação (KARAN, 2019).

Após o preparo das formulações, as características organolépticas foram avaliadas a fim de selecionar a formulação mais adequada quanto aos parâmetros de viscosidade e percepção sensorial. A avaliação dos hidrogéis mostrou que as formulações apresentaram a mesma cor, odor e homogeneidade. Os hidrogéis com maior concentração dos polímeros (2 % de alginato e CMC) conferiram feito *peel-off* à formulação, ou seja, após aplicação e secagem sobre a pele, ocorre a formação de um filme plástico fino que se desprende, como pode ser observado na imagem da Figura 8. Sendo assim, as formulações desenvolvidas não foram aprovadas, uma vez que a viscosidade e as características organolépticas (em especial, a sensação na pele) não se apresentaram adequadas para a finalidade desejada.

Com isso, para otimização da formulação, na etapa 2 foram realizadas adequações das concentrações dos polímeros alginato e CMC (1 a 1,5 %) e avaliação do volume de gel de babosa (5 a 20 %) que poderia ser agregado sem provocar alteração significativa da viscosidade e do pH. As 6 formulações preparadas não apresentaram variações de cor e textura ou agregados e partículas insolúveis mesmo após a aplicação de força centrífuga (3000 rpm). A avaliação do pH e viscosidade mostrou que a fórmula com gel de babosa apresentou pH e viscosidade mais baixos em comparação com o controle (sem adição do gel de babosa). O percentual de 15%

de gel de babosa foi selecionado para os ensaios posteriores.

Figura 8 – Aspecto plástico do hidrogel após aplicação na pele



Fonte: A autora.

Na Etapa 3, foram preparadas 4 formulações (Tabela 1) para os ensaios físico-químicos. Nessa etapa, os percentuais de alginato e gel de babosa foram mantidos em 1,5 % (m/v) e 15% (v/v), respectivamente. Avaliou-se o efeito da concentração de CMC (1 e 1,5 % (m/v)) e a adição de glicerina.

A glicerina reduz as forças intermoleculares e melhora a fluidez da cadeia polimérica do alginato (SILVA *et al.*, 2019). As interações entre a glicerina e o alginato por ligação de hidrogênio poderia estabilizar a estrutura da rede do hidrogel e melhorar a tolerância à secagem, evitando o efeito *peel-off* (da SILVA; BIERHALZ; KIECKBUSCH, 2009; WANG *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Formulações dos hidrogéis

Componentes	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Alginato	1,5	1,5	1,5	1,5
CMC	1,0	1,5	1,5	1,0
Glicerina	5,0	5,0	-	-
gel de babosa	15	15	15	15
benzoato de sódio	0,1	0,1	0,1	0,1
Imidazolidinilureia	0,2	0,2	0,2	0,2

Fonte: A autora.

5.2 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO

Após a fase de desenvolvimento, as formulações obtidas na etapa 3 foram submetidas à avaliação das propriedades físico-químicas. Inicialmente, foi realizado o teste de centrifugação, como uma análise prévia para posterior viabilidade da realização dos estudos de estabilidade.

O teste de centrifugação produz na formulação uma situação de estresse, simulando um aumento na força de gravidade, acrescentando maior mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Podem ser observadas precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto, coalescência, entre outros (BRASIL, 2004).

Todas as amostras permaneceram estáveis, sem formação de precipitado ou separação de fases após a centrifugação (3000 rpm por 30 minutos), indicando a adequação para realização do teste de estabilidade acelerada.

5.3 DENSIDADE RELATIVA

A densidade não é um parâmetro físico-químico estabelecido em resoluções e Farmacopeias para a avaliação da qualidade de hidrogéis, mas retrata a sua composição principalmente da concentração dos polímeros. A densidade relativa foi determinada para as formulações A-D, logo após o preparo e depois de 60 dias, mantidas à temperatura ambiente. Os valores de densidade relativa (Tabela 2) apresentaram-se dentro de uma faixa definida para um hidrogel de alginato (1,5 a 2,0),

sem variação significativa na condição de armazenamento. Isso sugere que não há mudança significativa na composição da amostra em consequência de reações entre os componentes da formulação, durante o período avaliado.

Tabela 2 – Densidade relativa de hidrogéis contendo gel de babosa mantidos à temperatura ambiente

Formulação	Densidade relativa	
	D0	D60
A	1,8705	1,8826
B	1,7848	1,7798
C	1,8813	1,8866
D	1,9013	1,9089

Fonte: A autora.

Observa-se que as formulações contendo glicerina (A e B) possuem valores inferiores de densidade relativa. Apesar da glicerina possuir uma densidade maior que a da água ($1,26 \text{ g/cm}^3$), a redução da densidade do hidrogel pode ser explicada pelo fato de ser uma molécula pequena, o que facilita a sua penetração entre as ligações de hidrogênio dos polímeros (alginato e CMC) resultando em forças intermoleculares reduzidas que aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas (JOST *et al.*, 2014).

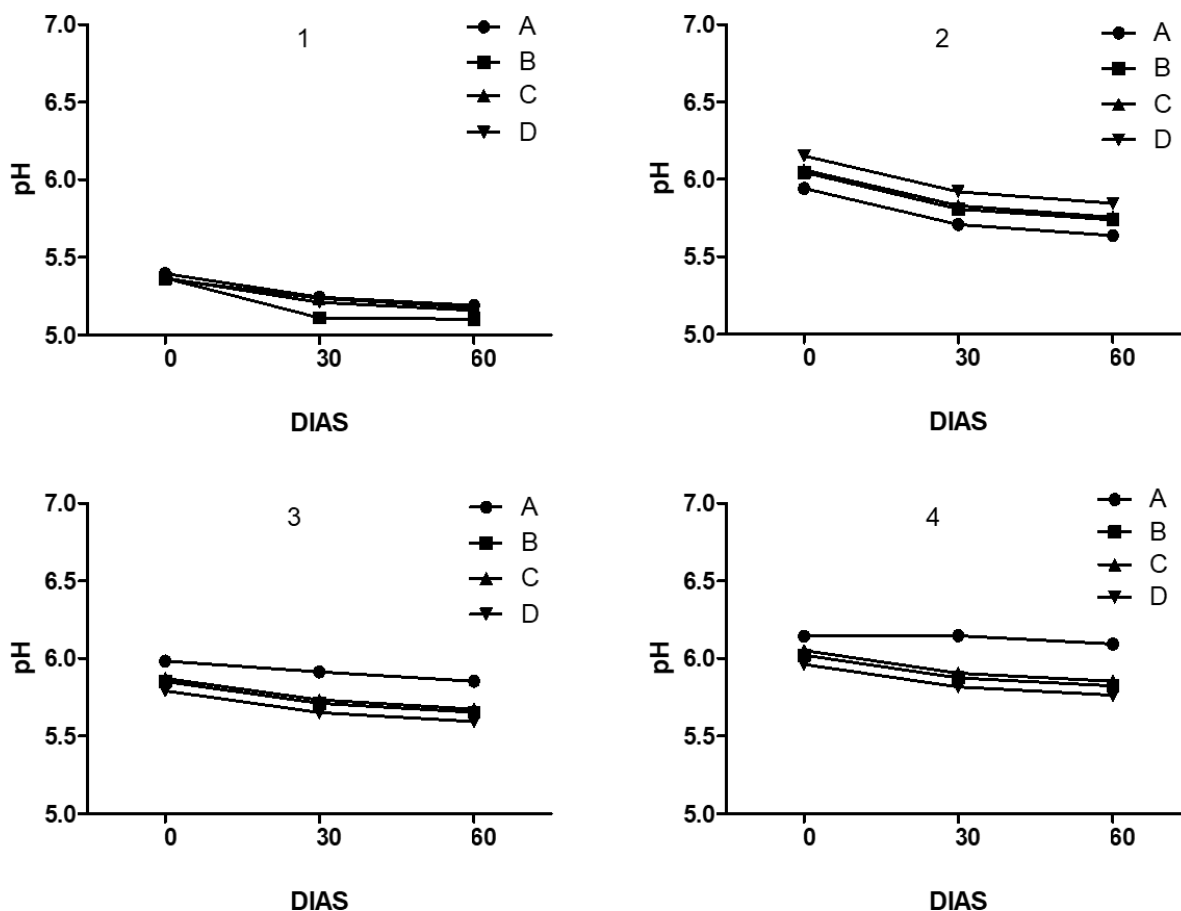
5.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA

Após a aprovação das formulações A, B, C e D no teste de centrifugação e por apresentarem características organolépticas adequadas à finalidade proposta, amostras do hidrogéis foram transferidas para tubos de vidro com tampa e separadas em 4 grupos, conforme as condições de armazenamento: $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (refrigerador); $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente); $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente com exposição à luz), e $45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (estufa).

5.4.1 Determinação do pH

Valores de pH médio das formulações A, B, C e D estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – pH médio de formulações de hidrogel alginato-babosa sob diferentes condições de armazenamento



Fonte: A autora.

Nota: 1= temperatura ambiente; 2= temperatura ambiente com exposição à luz; 3= sob refrigeração; 4= estufa.

É possível observar que não há diferença estatística significativa entre os tempos de execução do teste de estabilidade (0 a 60 dias), de modo que o tempo não interfere nos valores de pH das formulações, as quais mantiveram-se estáveis e dentro do valor desejado. Pode-se observar que não há diferença estatística significativa entre as formulações A, B, C e D quando armazenadas à temperatura ambiente (Figura 9,1).

Os valores médios de pH das 4 formulações são compatíveis com o pH da pele e, portanto, adequadas ao uso tópico. As pequenas variações dos valores experimentais de pH são inerentes ao método potenciométrico.

A pele humana não possui pH neutro e, dependendo da região do corpo ou da idade, o pH pode variar. Porém, de modo geral, o pH fisiológico da pele é entre 4,5 e 6,0, em maior parte devido às secreções das glândulas sudoríparas e sebáceas que,

ao promoverem um pH ácido, impedem a penetração ou colonização por microrganismos. O pH do tecido de uma ferida mantém-se ligeiramente ácido (5,8-6,6) para que as funções celulares ocorram adequadamente (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

Em feridas alcalinas, a síntese de moléculas da matriz extracelular é prejudicada, levando à interrupção da cicatrização e à cronificação. Como os produtos de células inflamatórias são em sua maioria ácidos, as feridas alcalinas estão associadas à resposta imunológica fraca e, conseqüentemente, à criação de um ambiente adequado para a colonização bacteriana, que pode levar à infecção da ferida. Por outro lado, verifica-se que os processos de cicatrização de feridas favorecidos por um ambiente ácido (VU *et al.*, 2020).

Portanto, o pH ligeiramente ácido dos hidrogéis alginato-babosa é favorável à aplicação em feridas crônicas. O meio ligeiramente ácido de uma formulação consegue inibir a contaminação microbiológica, ao contrário do pH neutro ou próximo da neutralidade, que favorece o crescimento de microrganismos, podendo comprometer a estabilidade do produto e, conseqüentemente, em perda da eficácia por degradação das matérias-primas e alteração nos parâmetros físicos (ANDRADE *et al.*, 2005).

5.4.2 Viscosidade

A viscosidade aparente foi determinada em amostras sob diferentes condições de armazenamento: 5 ± 2 °C (refrigerador); 25 ± 2 °C (temperatura ambiente); 25 ± 2 °C (temperatura ambiente com exposição à luz), e 45 ± 2 °C (estufa), em rotação de 6 rpm e os dados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Viscosidade aparente (Pa/s) de hidrogéis contendo gel de babosa armazenados sob diferentes condições

		5 ± 2 °C	TA	TA-Luz	45 ± 2 °C
	D0	0,20	0,21	0,22	0,24
A	D30	0,17	0,17	0,18	0,20
	D60	0,15	0,17	0,18	0,17
	D0	0,20	0,35	0,23	0,37
B	D30	0,14	0,15	0,18	0,23
	D60	0,15	0,15	0,27	0,22
	D0	0,20	0,18	0,20	0,21
C	D30	0,21	0,22	0,16	0,25
	D60	0,14	0,22	0,27	0,24
	D0	0,19	0,16	0,17	0,19
D	D30	0,12	0,13	0,14	0,26
	D60	0,11	0,12	0,27	0,26

Fonte: A autora.

Nota: D0= dia zero; D14= dia 14; D30= dia 30; TA = temperatura ambiente; TA-Luz= temperatura ambiente com exposição à luz.

Em relação à viscosidade das amostras avaliadas, não há limites regulamentados a serem seguidos e esta deve ser uma definição do próprio desenvolvedor da fórmula, considerando-se a indicação do produto, o público-alvo e a percepção visual e sensorial desejada.

Observa-se que as viscosidades da formulação C são superiores, uma vez que contém 50 % a mais do polímero CMC, um agente doador de viscosidade à formulação.

Levando em conta as condições esperadas nesta pesquisa, as formulações A e B são as que se apresentam com as características desejadas de viscosidade para utilização tópica em lesões cutâneas.

5.4.3 Espalhabilidade

A análise de espalhabilidade é um atributo extremamente importante no desenvolvimento de uma formulação tópica para aplicação em lesões de pele, pois afeta o desempenho do produto. Valores elevados de espalhabilidade facilitam a

aplicação do produto. Contudo, um valor demasiadamente alto pode fazer com que o produto escorra, impossibilitando sua aplicação apropriada.

A Tabela 4 apresenta o perfil de espalhabilidade das formulações A, B, C e D por tempo decorrido (0, 14 e 30 dias) e todas as formulações demonstraram perfil de espalhabilidade adequados para a aplicação desejada. As variações observadas podem ser atribuídas às diferentes temperaturas nos dias em que os ensaios foram realizados.

Tabela 4 - Espalhabilidade média de hidrogéis alginato-babosa armazenados sob diferentes condições

		5 ± 2 °C	TA	TA-Luz	45 ± 2 °C
A	D0	164,15 ± 4,98	191,04 ± 9,11	193,78 ± 9,83	193,72 ± 5,01
	D14	193,32 ± 3,79	195,97 ± 2,48	193,98 ± 4,05	188,84 ± 6,68
	D30	166 ± 4,33	176,62 ± 5,95	177,41 ± 6,68	189,76 ± 5,28
B	D0	160,77 ± 7,56	176,62 ± 11,33	178,64 ± 13,31	171,80 ± 13,22
	D14	177,28 ± 5,92	176,62 ± 9,42	182,08 ± 9,57	170,14 ± 4,89
	D30	167,93 ± 3,38	193,49 ± 15,99	199,96 ± 16,63	183,73 ± 4,59
C	D0	168,23 ± 2,16	176,62 ± 16,45	179,25 ± 16,96	177,61 ± 6,87
	D14	196,60 ± 5,10	181,37 ± 4,93	183,82 ± 6,61	202,87 ± 6,22
	D30	160,47 ± 2,21	198,45 ± 22,32	201,82 ± 19,47	194,85 ± 4,81
D	D0	187,26 ± 6,96	186,17 ± 7,88	188,50 ± 7,24	191,43 ± 7,15
	D14	193,88 ± 5,19	188,59 ± 8,59	191,72 ± 8,65	191,73 ± 3,63
	D30	169,30 ± 8,98	200,96 ± 5,27	211,82 ± 6,56	190,80 ± 5,46

Fonte: A autora.

Nota: TA = temperatura ambiente; TA-Luz= temperatura ambiente com exposição à luz. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

O parâmetro de espalhabilidade interfere, de forma significativa, na administração da formulação tópica na pele. Uma aplicação uniforme confere ao produto: rapidez de aplicação, credibilidade e melhor aceitação pelo público-alvo (SILVA *et al.*, 2019).

5.4.4 Análise de Características Organolépticas

Sob condições de armazenamento à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e em estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$), todas as formulações (A, B, C e D) permaneceram estáveis, sem alteração de cor, odor, aspecto e ausência de particulado, em todos os tempos de avaliação (0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias).

À temperatura ambiente, com exposição à luz forçada (em câmara adaptada com luz ligada de forma intermitente), as formulações permaneceram estáveis em relação a odor, integridade e presença de particulado. Porém, a partir de 7 dias de exposição apresentaram alteração de cor, passando de transparente para amarelo-claro, permanecendo assim até o final do teste, em todos os tempos de avaliação (Tabela 5).

Tabela 5 – Características organolépticas de formulações armazenadas à temperatura ambiente com exposição à luz.

FORMULAÇÃO	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 60
A	0	0	1	1	1	1
B	0	1	1	1	1	1
C	0	0	1	1	1	1
D	0	1	1	1	1	1

Fonte: A autora.

A condição da radiação luminosa, mostra-se inadequada, o que indica que o armazenamento da formulação deve ser realizado em frascos protegidos da luz (âmbar), conforme orientação do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011).

Para as amostras armazenadas sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ\text{C}$), as formulações permaneceram estáveis em relação a cor, odor, integridade e presença de particulado. Porém, a partir de 7 dias de exposição apresentaram alteração de aspecto, passando de uma formulação semissólida de baixa viscosidade à uma de alta viscosidade e com alteração de aspecto (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise de características organolépticas de formulações armazenadas sob refrigeração

FORMULAÇÃO	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 60
A	0	0	0	1	1	1
B	0	1	1	1	1	1
C	0	1	1	1	1	1
D	0	0	0	1	1	1

Fonte: A autora.

Diante da avaliação destes aspectos, definiu-se que a sequência das análises no presente trabalho se daria com a formulação A, a qual foi submetida aos testes de avaliação *in vitro* na sequência.

5.5 AVALIAÇÃO IN VITRO

5.5.1 Avaliação da Viabilidade Celular

Pelo ensaio de MTT é possível avaliar a viabilidade celular. Este ensaio corresponde a uma análise colorimétrica, a qual utiliza do reagente de MTT, que reduz a um cristal insolúvel de coloração roxa (formazan) em presença de células viáveis, com metabolismo ativo (MOSMANN, 1983; RISS *et al.*, 2004).

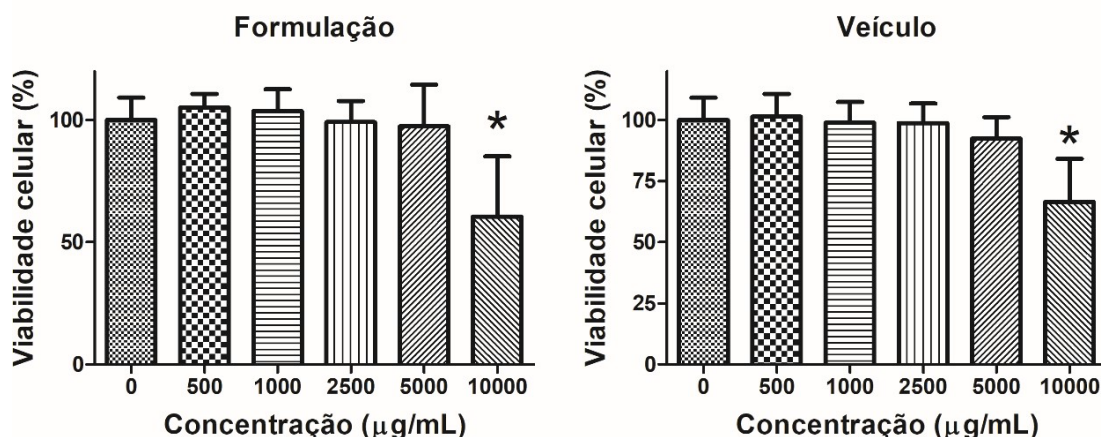
O ensaio de SRB também corresponde a uma análise colorimétrica, porém, é utilizado para determinação da densidade celular com base na medição do teor de proteína celular (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Tanto o ensaio de MTT quanto o de SRB são métodos práticos e eficientes, sendo, portanto, altamente econômicos e vantajosos para a triagem e quantificação da viabilidade celular no presente estudo.

Frente a isso, na Figura 10 é possível observar a viabilidade celular da linhagem 3T3 ao ser submetida ao tratamento (em diferentes concentrações) com a formulação de hidrogel de babosa pelo ensaio de MTT, de modo que somente na maior concentração testada (10000 µg/mL) a formulação mostrou uma redução na viabilidade celular, com diferença estatística significativa em relação ao controle. Já para o veículo (formulação sem adição do gel de babosa), houve redução da viabilidade celular nas duas maiores concentrações testadas. Comparando os dados

obtidos para a formulação e para o veículo, estatisticamente não há diferença entre eles.

Figura 10 – Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com formulação de hidrogel contendo gel de babosa por MTT

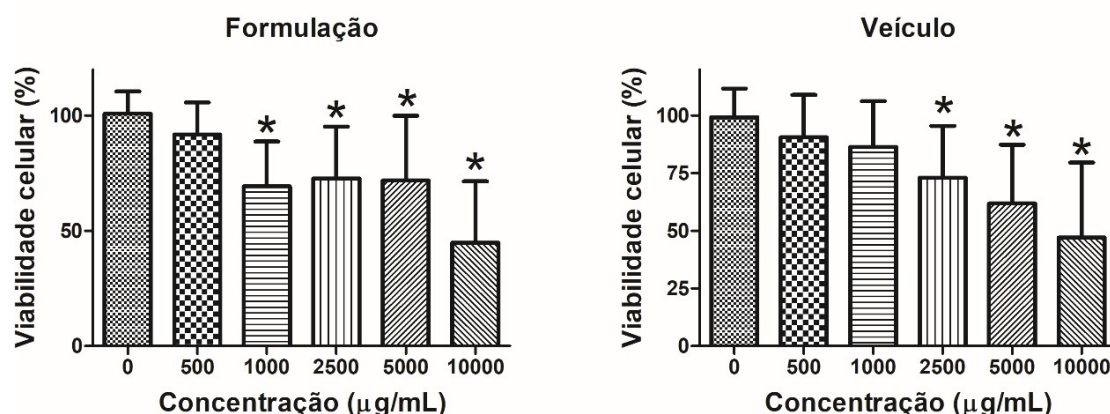


Fonte: A autora.

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

Na Figura 11 é possível observar a viabilidade celular da linhagem 3T3 ao ser submetida ao tratamento em diferentes concentrações com a formulação de hidrogel de babosa pelo ensaio de SRB. Nesta análise, para a formulação contendo o gel de babosa, somente a menor concentração testada (500 µg/mL) não demonstrou redução na viabilidade celular. Todas as demais concentrações (1000 a 10000 µg/mL) apresentaram diminuição na viabilidade, com diferença estatística significativa em relação ao controle. Já para o veículo (formulação sem adição do gel de babosa), não houve redução da viabilidade celular nas duas menores concentrações testadas (500 e 1000 µg/mL), sendo que as demais (2500 a 10000 µg/mL) apresentaram diminuição da viabilidade, com diferença estatística significativa em relação ao controle. Comparando os dados obtidos para a formulação e para o veículo, estatisticamente não há diferença entre eles.

Figura 11 – Viabilidade celular da linhagem 3T3 tratada com formulação de hidrogel contendo gel de babosa por SRB



Fonte: A autora.

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

Shafaie *et al.* (2020) também realizaram um estudo com avaliação de *Aloe vera*. por ensaio de MTT e seus resultados revelaram que a espécie não apresenta toxicidade nas linhagens celulares de fibroblastos e células endoteliais, testadas após 24 e 48 h, preservando a viabilidade celular nas duas linhagens testadas. Os fibroblastos proliferaram significativamente nas primeiras 24 h, sendo superior no grupo tratado com *Aloe vera* em comparação ao grupo controle.

Hajian, Mahmoodi e Imani (2017), ao avaliar a viabilidade de filmes de hidrogel compostos de álcool polivinílico (PVA) e gel extraído de *Aloe vera*, concluíram que o gel de babosa pode melhorar positivamente a bioatividade dos filmes sem qualquer citotoxicidade.

Dadashzadeh *et al.* (2020) testaram uma formulação de hidrogel de alginato/gelatina com liberação sustentada de *Aloe vera* como potencial curativo para feridas cutâneas e, ao avaliar o efeito da incorporação e liberação da babosa na proliferação de células de fibroblastos por MTT, observaram que houve uma maior proliferação celular nas amostras que a continham.

5.5.2 Ensaio de Migração Celular

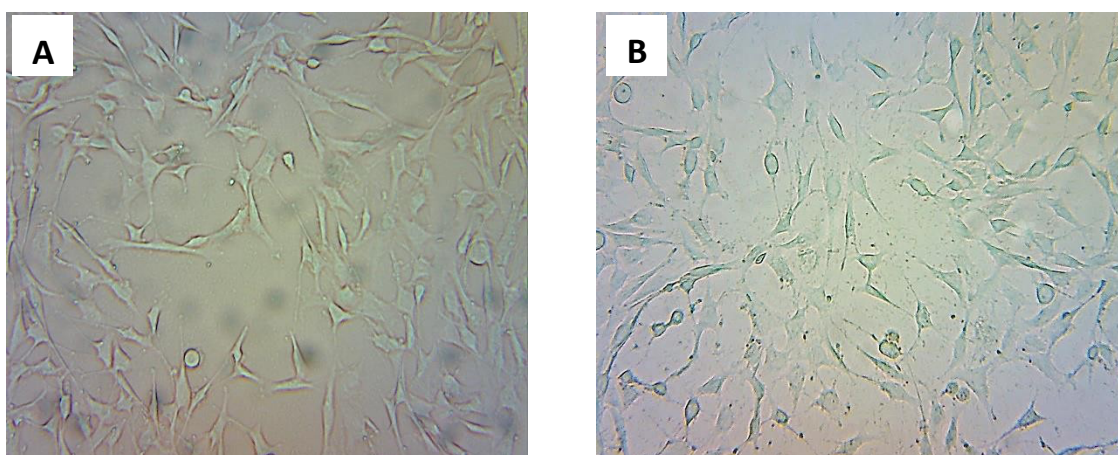
O ensaio de raspagem (*Scratch assay*) é um método direto e econômico para estudar a migração celular *in vitro*. Este método é baseado na observação de que, após a criação de uma lacuna artificial, chamada de "arranhão", em uma monocamada

de células confluentes, as células na borda da lacuna recém-criada se moverão em direção à abertura para fechar o "arranhão" até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente. Uma das principais vantagens deste método simples é que ele simula, em certa medida, a migração de células *in vivo*. Por exemplo, a remoção de parte do endotélio nos vasos sanguíneos irá induzir a migração de células endoteliais para a área arranhada, a fim de promover o fechamento da ferida (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Dentre os efeitos de cicatrização de feridas do gel de *Aloe barbadensis* temos: a manutenção da ferida úmida, aumento na migração de células epiteliais, maturação do colágeno e redução da inflamação (HAMMAN, 2008).

Em relação a cultura das células 3T3 não foram vistas alterações morfológicas nas células tratadas com formulação contendo gel babosa (Figura 12) em comparação com as tratadas com formulação sem o gel de babosa.

Figura 12 – Morfologia das células 3T3 durante o ensaio de migração celular



Fonte: A autora.

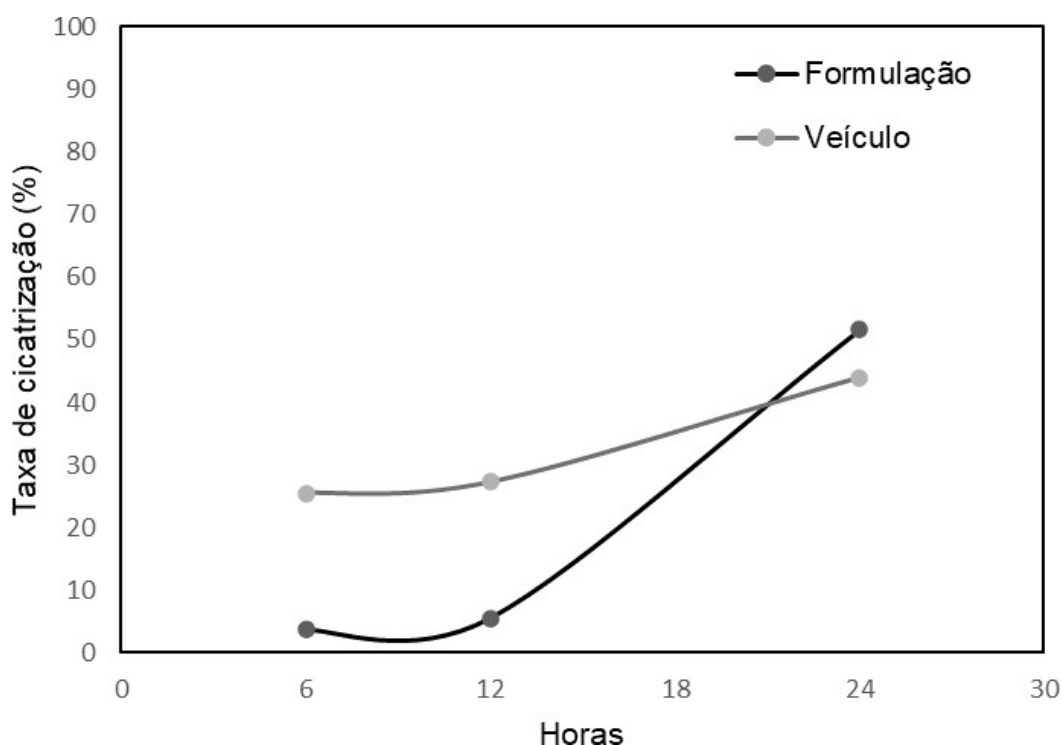
Nota: A=Veículo; B=Formulação. Aumento de 40x.

A morfologia de fibroblastos e células endoteliais com e sem *Aloe vera* também foi observada usando o microscópio invertido por Shafaie *et al.* (2020), e nenhuma alteração morfológica foi detectada nas células endoteliais tratadas com *Aloe vera* em comparação com o grupo controle.

Através dos dados de fechamento das lesões (Figura 13), pode-se observar que a formulação contendo o gel de babosa acelerou significativamente o fechamento da ferida por meio da migração de células para a área analisada. Resultado

comparável ao obtido por Negahdari *et al.* (2017), os quais descreveram que a *Aloe vera* pode aumentar a migração e proliferação de células de fibroblastos.

Figura 13 – Taxa de cicatrização obtida na análise de migração celular



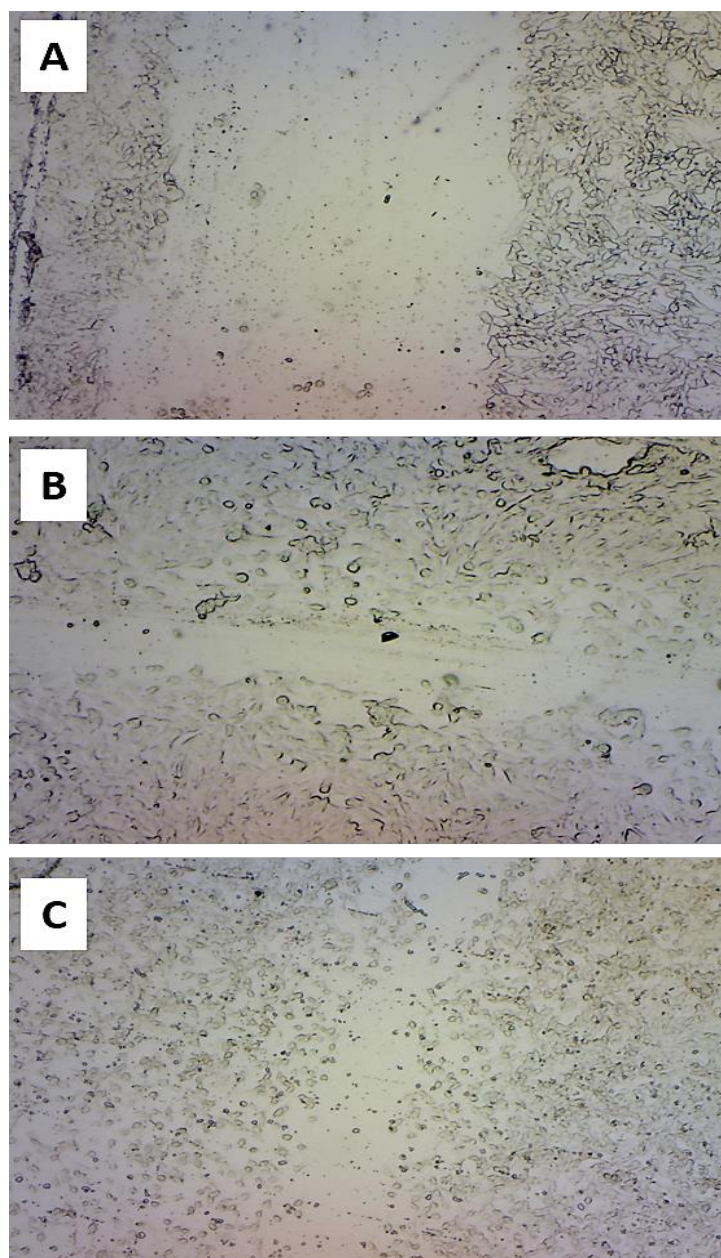
Fonte: A autora

Jettanacheawchankit *et al.* (2009) investigaram e concluíram que a acemanana, composto presente na espécie *Aloe barbadensis*, tem grande influência no processo de cicatrização de feridas orais por meio da indução da proliferação de fibroblastos.

Adicionalmente, outros estudos relataram em ensaios *in vitro* que a *Aloe vera* aumenta a migração e a proliferação de fibroblastos em direção à área do arranhão (SHAFAIE *et al.* 2020; TEPLICKI *et al.* 2018).

Geralmente, os fibroblastos migram para o local da ferida num período de 48 a 72 h após a lesão. A migração de fibroblastos na área do arranhão é provavelmente o resultado da migração celular absoluta, proliferação e morte celular (CHEN; ZHOU; FANG, 2003). No presente estudo, os resultados obtidos demonstram que houve fechamento significativo da lacuna da lesão causada após 24 horas de tratamento em comparação com o controle não tratado (Figura 14).

Figura 14 – Processo de fechamento da lesão após 24 h de teste de migração celular



Fonte: A autora.

Nota: A=Controle; B=Formulação; C=Veículo.

A espécie *Aloe barbadensis*, ao longo dos anos, vem sendo utilizada em diversas aplicações terapêuticas. Na literatura, estudos comprovam que *Aloe barbadensis* possui potencial de cicatrização de feridas. A proposta de desenvolver uma formulação curativa para o tratamento de lesões cutâneas em que a tecnologia do hidrogel está associada às propriedades terapêuticas do extrato de *Aloe barbadensis* mostra-se promissora dentro da terapêutica (FREITAS-BLANCO; RODRIGUES; GASPI, 2014).

5 CONCLUSÃO

Os hidrogéis preparados com alginato e CMC permaneceram estáveis na avaliação preliminar de centrifugação após a adição do gel de babosa e apresentaram pH compatível com a pele. A combinação adequada das proporções dos polímeros e a adição de glicerina resultou em hidrogéis sem efeito o *peel-off* após a secagem e com características de viscosidade e espalhabilidade adequadas ao uso pretendido como curativo de feridas. As formulações também permaneceram estáveis nas condições de armazenamento e exposição à luz durante o tempo avaliado.

Os testes em cultura de células tratadas com a formulação A evidenciaram que morfologia das células foi mantida, bem como a viabilidade e a capacidade de multiplicação celular. O ensaio *scratch assay* demonstrou que a formulação contendo gel de babosa acelera o processo de migração celular quando comparada à formulação sem o gel.

Os hidrogéis alginato-babosa podem ser submetidos às análises de cicatrização *in vivo* e possuem potencial aplicação no tratamento como cicatrizante de lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

ABASALIZADEH, F. *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**, 2020; 14:8. Errata em: **Journal of Biological Engineering**, 2020; 14:17.

ADERIBIGBE, B. A.; BUYANA, B. Alginate in Wound Dressings. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, pg. 42, 2018.

ALAVI, M.; RAI, M. Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8669-8676, 2019.

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, 2005.

BARRIENTOS, S. *et al.* Growth factor and cytokines in feridas. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585–601, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília, DF, 2011.

CALIRI, M. H. L. *et al.* Novas tecnologias no cuidado de feridas. In PROENF Programa de Atualização em Enfermagem: Ciclo 8. Volume 3. Porto Alegre: Artmed Panamericana, 2013.

CHABLAIS, F.; JAZWINSKA, A. IGF signaling between blastema, and wound epidermis is required for fin regeneration. **Development**, v. 137, n. 6, p. 871-979, 2010.

CHEN, H. H.; ZHOU, H. J.; FANG, X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 3, p. 231-236, 2003.

COOPER, R. A; MOLAN, P. C; HARDING, K. G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, n. 6, p. 283-285, 1999.

CUNHA, M. G. D. *et al.* Anatomical, histological and metabolic differences between hypodermis and subcutaneous adipose tissue. **International Archives of Medicine**, 2017.

da SILVA, M. A., BIERHALZ, A. C. K., KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 736-742, 2009.

DADASHZADEH, A. *et al.* Study of hybrid alginate/gelatin hydrogel-incorporated niosomal *Aloe vera* capable of sustained release of *Aloe vera* as potential skin wound dressing. **Polymer Bulletin**, v. 77, p. 387-403, 2020.

DEALEY, C. Skin Care and Pressure Ulcers. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 22, n. 9, p. 421-428, 2009.

EL-KASED, R. F, *et al.* Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. **Scientific Reports**, v. 29, ed. 7, n. 1, p. 9692, 2017.

FOOD INGREDIENT BRASIL. Os alginatos e suas múltiplas aplicações. **Revista Food Ingredient Brasil**, n. 26, 2013. Disponível em: https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060847415001464961683.pdf. Acesso em: jun 2020.

FRANCO, D.; GONCALVES, L. F. Lesões cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203- 206, 2008.

FREITAS-BLANCO, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 299-307, 2014.

GONZALEZ, A. C. O. *et al.* Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

GYLES, D. A. *et al.* Polyacrylamide-metilcellulose hydrogels containing *Aloe barbadensis* extract as dressing for treatment of chronic cutaneous skin lesions. **Polymers**, v. 12, n. 3, p. 690, 2020.

HAJIAN, M.; MAHMOODI, M.; IMANI, R. In vitro assessment of poly (vinyl alcohol) film incorporating *Aloe vera* for potential application as a wound curing. **Journal of Macromolecular Science**, v. 56, n. 7, p. 435-450, 2017.

HAMMAN, J. H. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. **Moléculas**, v. 13, n. 8, p. 1599-1616, 2008.

HASHEMI, S. A.; MADANI, S. A.; ABEDIANKENARI, S. The review on properties of *Aloe vera* in healing of cutaneous wounds. **BioMed Research International**, 2015.

HENRIQUES, A. *et al.*, Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 773-777, 2006.

JETTANACHEAWCHANKIT, S. *et al.* Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 109, n. 4, p. 525-531, 2009.

JOAQUIM, F. L. *et al.* Impacto das úlceras venosas na qualidade de vida dos pacientes: revisão integrativa. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, n. 4, p. 2021-2029, 2018.

JOST, V. *et al.* Influence of plasticiser on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 309- 319, 2014.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-399, 2002.

KARAN. T. D. In: Handbook of pharmaceutical wet granulation, **Academic Press**, 2019.

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. **Avaliação do efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa *Aloe vera* (L.) Burm.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Fisiologia e Fisiopatologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

KOGA, A. Y. *et al.* Evaluation of wound healing effect of alginate films containing *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, n. 9, p. 1212–1221, 2018.

KOLARSICK, P. A.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, p. 203-213, 2011.

KUMAR, L. *et al.* Antimicrobial biopolymer formation from sodium alginate and algae extract using aminoglycosides. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0214411, 2019.

KUOK, K.; JIN, Y., WANG, R. Biomedical applications of *Aloe vera*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. S244-S256, 2019.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

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, 2002.

LI, S. *et al.* Imaging in chronic wound diagnostics. **Advances in wound care (New Rochelle)**, v. 9, n. 5, p. 245-263, 2020.

LIANG, C. C.; PARK, A.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, p. 329–333, 2007.

MENDONÇA, R. J., COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MIR, M. *et al.* Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Progress in Biomaterials**, v. 7, n. 1, p. 1-21, mar. 2018.

MORIYAMA, M. *et al.* Beneficial effects of the genus aloe on wound healing, cell proliferation, and differentiation of epidermal keratinocytes. **PLoS One**, v. 13, n. 11(10), 2016.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEGAHDARI, S. *et al.* Wound healing activity of extracts and formulations of *Aloe vera*, henna, adiantum capillus-veneris, and myrrh on mouse dermal fibroblast cells. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 8, n. 18, 2017.

O'DONOGHUE, J. M. *et al.* Calcium alginate dressings promote healing of split skin graft donor sites. **Acta Chirurgiae Plasticae**, v. 39, n. 2, p. 53–55, 1997.

OLIVEIRA, I. V. P. M., DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

OLIVEIRA, S. H. S., SOARES, M. J. G. O., ROCHA, P. S. Uso de cobertura com colágeno e *Aloe Vera* no tratamento de lesão isquêmica: estudo de caso. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, n. 44, v. 2, p. 346-351, 2010.

OLSHANSKY, K. An excellent review. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 32, n. 6, p. 250, 2019.

ORYAN, A. *et al.* Healing potential of injectable *Aloe vera* hydrogel loaded by adipose-derived stem cell in skin tissue-engineering in a rat burn wound model. **Cell and Tissue Research**, v. 377, p. 215–227, 2019.

PEREIRA, R. *et al.* Development of novel alginate-based hydrogel films for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 221-230, 2013.

PEREIRA, R., MENDES, A., BÁRTOLO, P. Alginate/*Aloe vera* hydrogel films for biomedical applications. **Procedia CIRP** 5, p. 210-215, 2013.

PEREIRA R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advanced Wound Care (New Rochelle)**, v. 1, n. 5, p. 208-229, 2016.

PROST-SQUARCIONI, C. *et al.* Histologie fonctionnelle du derme [Functional

histology of dermis]. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 135, n. 1, p. 1S5-20, 2008.

RAMALHO, M. P. *et al.* Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: revisão de literatura. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 3, n. 2; 2018.

Riss, T. L. *et al.* Cell viability assays. Mai. 2013. In: Markossian, S. *et al.* Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

SÁNCHEZ, M. *et al.* Pharmacological update properties of *Aloe vera* and its major active constituents. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1324, 2020.

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

SHAFIAIE, S. *et al.* Differential biological behavior of fibroblasts and endothelial cells under *Aloe vera* gel culturing. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 234-246, 2020.

SILVA, F. *et al.* Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaífera officinalis* L. (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. e974.

SORG, H. *et al.* Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1-2, p. 81–94, 2016.

STECCO, C. *et al.* Subcutaneous tissue and superficial fascia. **Functional Atlas of the Human Fascial System**, p. 21-49, 2015.

SURJUSHE, A.; VASANI, R.; SAPLE, D. G. *Aloe vera*: a short review. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 4, p. 163-166, 2008.

TEPLICKI, E. The effects of *Aloe vera* on wound healing in cell proliferation, migration, and viability. **Wounds**, v. 30, n. 9, p. 263-268, 2018.

THE PLANT LIST. 2019. *Aloe*. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Xanthorrhoeaceae/Aloe/>. Acesso em: jun. 2019.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112-1116, 2006.

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.

WANG, X. *et al.* Modulation effect of glycerol on plasticization and water distribution of vacuum-dried calcium alginate gel beads encapsulating peppermint oil/ β -cyclodextrin complex. **Food Bioscience**, v. 41, 2021.

WERNER, S., GROSE, R. Regulamento da cicatrização de feridas por fatores de crescimento e citocinas. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WONG, R. *et al.* The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**. 2015.

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