

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ÁREA DE FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

ADRIANA YURIKO KOGA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DE FILMES DE ALGINATO
CONTENDO GEL DE BABOSA *Aloe vera* (L.) Burm. f.**

PONTA GROSSA

2017

ADRIANA YURIKO KOGA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DE FILMES DE ALGINATO
CONTENDO GEL DE BABOSA - *Aloe vera* (L.) Burm. f.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira

PONTA GROSSA

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

I64 Koga, Adriana Yuriko
Avaliação do efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa - Aloe vera (L.) Burm. f./ Adriana Yuriko Koga. Ponta Grossa, 2017.
68f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Ailton Vicente Pereira.

1.Alginato. 2.Filme. 3.Babosa. 4.Curativo. 5.Cicatrização. I.Pereira, Ailton Vicente. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD: 615.321

Adriana Yuriko Koga

Avaliação do efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa *Aloe vera* (L.) Burm. f.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas.

Ponta Grossa, ____ de ____ de ____.

Prof. Dr. Airton Vicente Pereira- Orientador
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Rudiger Daniel Ollhoff
Doutor em Microbiologia Clínica
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
Doutor em Farmacologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa



**Universidade Estadual
de Ponta Grossa**

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



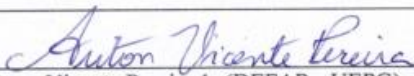
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLÓGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 01/2017, DA MESTRANDA ADRIANA YURIKO KOGA REALIZADO NO DIA 23 DE FEVEREIRO DE 2017, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e três dias de fevereiro de dois mil e dezessete, às 09h30min na sala 93-C, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Airton Vicente Pereira** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Adriana Yuriiko Koga** na linha de pesquisa; Pesquisa de Composto com Atividades Biológicas, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Gilson Cesar Nobre Franco (UEPG/PR)** e **Professor Dr. Rudiger Daniel Ollhoff (PUC/Pr)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata 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: **“Avaliação do Efeito Cicatrizante de Filmes de Alginato Contendo Gel de Babosa – Aloe Vera (L) burm.f.”** Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROXADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno 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.

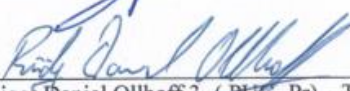
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Airton Vicente Pereira 1- (DEFAR - UEPG)- Presidente


Gilson Cesar Nobre Franco 2- (DEBIO - UEPG) – Titular


Rudiger Daniel Ollhoff 3- (PUC- Pr) – Titular

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2017.

*Dedico este trabalho aos
meus pais João e Marisa
e aos meus irmãos
Fernando e Marcelo*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me guiar e proteger. Pelas oportunidades, e pelas pessoas iluminadas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais João e Marisa que são meus maiores exemplos, pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho. Pelos valores que me ensinaram, por todo amor e carinho.

Aos meus irmãos Fernando e Marcelo que são minhas fontes de inspiração e força. Por todos os sorrisos e pelo companheirismo de sempre.

À todos os mestres que contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial ao Prof. Dr. Airton, pela paciência e orientação na execução deste trabalho. Por toda dedicação e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Leandro pela ajuda durante a realização dos experimentos animais e análise estatística, por todo esforço e dedicação.

À Prof. Dra. Marcia pela contribuição em todas as etapas das análises histológicas, pelo empenho e otimismo.

Ao meu namorado Eduardo por todo o amor e carinho. Pela paciência e companheirismo.

À Fernanda pela contribuição e amizade.

À Tia Julia por todo auxílio e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas

À PROPESP pelo auxílio financeiro

À Universidade Estadual de Ponta Grossa

À todas as pessoas que encontrei durante essa caminhada e que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

KOGA, A. Y. Avaliação do efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa *Aloe vera* (L.) Burm. f. 2017. 68f. Dissertação de mestrado em Ciências Biomédicas - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

O alginato é um polímero extraído de algas marinhas e tradicionalmente utilizado na fabricação de curativos. A propriedade de formar géis e filmes faz com que o alginato proporcione um ambiente favorável à cicatrização e a re-epitelização do tecido lesado. *Aloe vera* (L.) Burm. f., popularmente conhecida como babosa, é uma planta medicinal que apresenta propriedades analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um filme de alginato contendo gel de babosa e avaliar o seu efeito cicatrizante *in vivo*. O filme foi obtido por evaporação de uma solução aquosa de alginato de sódio contendo glicerina, gel de babosa e reticulado com cloreto de cálcio. O filme foi caracterizado por ensaios de resistência mecânica a tração, hidratação, espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura e liberação de polissacarídeos e íons cálcio. Na avaliação do efeito cicatrizante, foi utilizado o modelo de lesão cirúrgica na pele da região cervico-lombar de ratos Wistar. Os animais (n=60) foram divididos em três grupos: curativos com gaze (controle), curativos com filme de alginato e curativos com filme alginato-babosa. As medidas da retração das feridas foram realizadas a cada 3 dias. Nos dias 3, 7, 14 e 22 cinco animais de cada grupo foram eutanasiados e um fragmento de pele foi retirado e fixado em formol 10%. As análises histológicas dos tecidos foram realizadas utilizando-se coloração hematoxilina eosina para quantificação de infiltrado inflamatório, avaliação da angiogênese e contagem de macrófagos. As fibras colágenas foram avaliadas utilizando a coloração picrosirius red para diferenciação das fibras de tipo I e III. As análises físico-químicas do filme evidenciaram características ideais para a aplicação como curativos. No ensaio do efeito cicatrizante, não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação da retração da lesão. Os resultados das análises histológicas mostraram uma diminuição do infiltrado inflamatório com os filmes alginato-babosa ($p=0,04$) e alginato ($p=0,05$) no 14^o dia, em relação ao grupo controle. No 7^o dia, observou-se uma maior angiogênese no grupo controle comparado aos grupos filme alginato-babosa ($p=0,04$) e alginato ($p=0,024$). O tratamento com o filme alginato-babosa aumentou o número de vasos sanguíneos no dia 14, quando comparado ao grupo

controle ($p=0,004$); além disso, ocasionou uma diminuição mais expressiva de macrófagos no dia 22, quando comparado aos demais grupos (filme alginato ($p=0,0$) e controle ($p=0,007$)). A avaliação das fibras colágenas mostrou uma diferença significativa entre os grupos filme alginato-babosa e controle, com evidente diminuição das fibras tipo III ($p=0,05$) e aumento das fibras tipo I ($p=0,024$) entre os dias 14 e 22, sugerindo uma melhora na progressão do processo de cicatrização.

Palavras-chave: Alginato, filme, babosa, curativo, cicatrização.

ABSTRACT

KOGA, A. Y. Avaliação do efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa *Aloe vera* (L.) Burm. f. 2017. 68f. Dissertação de mestrado em Ciências Biomédicas - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

Alginate is a polymer extracted from seaweed and traditionally used in various types of wound dressings. It is a polysaccharide which has bioadhesive and swelling characteristics. The ability of alginate to form gel and films provides a favorable environment for healing and re-epithelialization of the injured tissue. *Aloe vera* (L.) Burm. f., or simply *Aloe*, is a medicinal plant with analgesic, anti-inflammatory and healing properties. The purpose of this study was to develop an alginate film containing *Aloe* gel and examine its cutaneous healing effect *in vivo*. The film was obtained by casting of the aqueous sodium alginate solution containing glycerin and *Aloe* gel, followed by crosslinking with calcium chloride. The film was characterized by mechanical tensile strength, hydration degree, FTIR spectroscopy, scanning electron microscopy, polysaccharide and calcium release. The wound healing effect was studied by performing surgical wounds in the back of Wistar rats. The animals (n = 60) were divided into three groups: gauze dressings (control), dressing with alginate film and dressing with alginate-aloe film. The retraction of wounds was measured every 3 days. On days 3, 7, 14, 22 five animals from each group were euthanized and samples of skin were removed and fixed in formalin 10%. The samples for histological analysis were stained with hematoxylin-eosin and analyzed for quantification of inflammatory infiltrate, angiogenesis and macrophages. Collagen fibers were evaluated using a picosirius red staining for differentiation of type I and III fibers. The alginate-aloe film exhibited desirable physical and mechanical characteristics for the wound dressing application. *In vivo* animal test revealed there was no significant difference among the three groups in wound retraction. The results of histological analysis showed a beneficial effects of alginate-aloe ($p=0.04$) and alginate films ($p=0.05$) decreasing the inflammatory infiltrate at 14th days, in relation to the control group. On the 7th day, there was an increased angiogenesis in the control group compared to the group treated with alginate-aloe films ($p = 0.04$) and alginate ($p = 0.024$). Treatment with alginate-aloe film increased the number of blood vessels on the 14th day, when compared to the control group ($p = 0.004$); in addition, it caused decrease of macrophages on day 22, when compared to the other groups (alginate film ($p = 0,0$) and control ($p = 0.007$)). The evaluation of the collagen fibers showed a significant difference between the alginate-aloe film and control group, with evident decrease of type III fibers ($p = 0.05$) and increase of type I fibers ($p = 0.024$) between days 14 and 22, suggesting an improvement in the progression of the healing process.

Keywords: Alginate, film, *Aloe vera*, dressing, healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da pele	16
Figura 2. Etapas da cicatrização: (a) logo após a lesão, ocorre extravasamento de sangue, agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação. (b) formação de um tampão rico em fibrina. (c) as plaquetas liberam mediadores químicos que atraem neutrófilos (células fagocíticas) sinalizando o início da inflamação. (d) os neutrófilos começam a ser substituídos por macrófagos que além de fagocitar restos celulares, liberam fatores de crescimento e iniciam a fase proliferativa. (e) angiogênese aumentada e síntese de colágeno. (f) restabelecimento da integridade da pele	19
Figura 3. Estruturas moleculares de sequências de subunidades de ácido gulurônico e ácido manurônico (a) bloco G, b) bloco M e c) bloco MG	28
Figura 4. Ilustração esquemática do modelo “caixa de ovos” com a zona de junção do íon Ca^{2+} com o alginato	30
Figura 5. <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f	32
Figura 6. <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f. com inflorescência.....	33
Figura 7. Estrutura química de unidades do polissacarídeo acemanana	34
Figura 8. Espectro de infravermelho do alginato em pó, filme branco sem reticulação e alginato-babosa.....	41
Figura 9. Microscopia eletrônica do filme alginato-babosa não reticulado (a) e reticulado com CaCl_2 (b).....	42
Figura 10. Ensaio de resistência mecânica à tração dos filmes alginato-babosa não reticulado e reticulado com CaCl_2	43
Figura 11. Liberação de cálcio do filme alginato-babosa reticulado com CaCl_2	44
Figura 12. Hidratação do filme alginato-babosa reticulado.....	45
Figura 13. Teor de polissacarídeos no gel de babosa “ <i>in natura</i> ”, após gelo-degelo e no ensaio de liberação do filme alginato-babosa reticulado	46
Figura 14. Crescimento microbiano no ensaio de esterilização de filmes alginato-babosa reticulado	47

Figura 15. Retração da área da lesão dos animais nos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle	47
Figura 16. Imagem das lesões do ensaio de retração das feridas dos animais dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7,14 e 22	48
Figura 17. Fotomicrografia das feridas dos animais tratados com filme alginato babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22. Presença de infiltrado inflamatório (→), vasos sanguíneos (*) e macrófagos (M). Coloração HE, aumento 400x	49
Figura 18. Infiltrado inflamatório dos grupos filme alginato-babosa, filme de alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22	50
Figura 19. Macrófagos dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22	52
Figura 20. Vasos sanguíneos dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22	53
Figura 21. Fibras colágeno tipo III dos grupos controle, filme alginato e filme alginato-babosa nos dias 14 e 22.....	55
Figura 22. Fibras colágeno tipo I dos grupos controle, filme alginato e filme alginato-babosa nos dias 14 e 22	55
Figura 23. Aspecto das fibras colágenas I e III dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 14 e 22. Coloração Picrosirius Red, aumento 200x	56

LISTA DE SIGLAS

GAGs – glicosaminoglicanos

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

IGF-1 – fator de crescimento de plaquetas 1

EGF – fator de crescimento epidérmico

TNF- β – fator de necrose tumoral β

TGF- β – fator de crescimento transformante β

TNF- α – fator de necrose tumoral α

IL-1 – interleucina 1

TGF- α – fator de crescimento transformante α

VEGF – fator de crescimento vascular

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

MEC – matriz extracelular

EGF – fator de crescimento epidérmico

KGF – fator de crescimento dos queratinócitos

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Pele	16
2.1.1 Epiderme	16
2.1.2 Derme.....	17
2.1.3 Hipoderme	19
2.2 Lesão cutânea.....	19
2.2.1 Hemostase	20
2.2.2 Inflamação	20
2.2.3 Proliferação tecidual	21
2.2.4 Angiogênese	22
2.2.5 Síntese de colágeno.....	23
2.2.6 Re-epitelização.....	24
2.2.7 Remodelação tecidual	24
2.3 Feridas	25
2.4 Curativos	26
2.5 Alginato	28
2.6 <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	32
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35

3.2 Específico.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Coleta do material vegetal e extração do gel	36
4.2 Preparo e reticulação dos filmes	36
4.3 Análises físico-químicas dos filmes	36
4.3.1 Espectroscopia no infravermelho	36
4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	36
4.3.3 Ensaio de resistência mecânica à tração	37
4.3.4 Ensaio de liberação de cálcio do filme alginato-babosa reticulado	37
4.3.5 Hidratação do filme alginato-babosa	37
4.3.6 Ensaio de quantificação e liberação de polissacarídeos	37
4.4 Ensaio de esterilização dos filmes	38
4.5 Ensaio de cicatrização	38
4.5.1 Avaliação da retração da lesão	39
4.6 Análise histológica	39
4.6.1 Coloração hematoxilina eosina	39
4.6.2 Picrosirius red	39
4.7 Análise estatística	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Análise físico-química	41
5.1.1 Espectroscopia no infravermelho	41
5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura	42

5.1.3 Ensaio de resistência mecânica à tração	42
5.1.4 Ensaio de liberação de cálcio do filme alginato-babosa reticulado	43
5.1.5 Hidratação do filme alginato babosa reticulado	44
5.1.6 Ensaio de quantificação e liberação de polissacarídeos	45
5.2 Ensaio de esterilização dos filmes	46
5.3 Ensaio de cicatrização	47
5.3.1 Análise da retração da lesão	47
5.4 Análise histológica	49
5.4.1 Processo inflamatório	49
5.4.2 Angiogênese	53
5.4.3 Fibras colágeno	54
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS	59

1. Introdução

As feridas cutâneas são resultantes de agressões à estrutura da pele causadas por ação de um agente externo. A integridade da pele pode ser comprometida por traumas, queimaduras, cortes e cirurgias. As lesões podem ser classificadas de acordo com o tipo de agente causal, grau de contaminação e profundidade. Por atingir um grande número de pessoas em todo o mundo, existe um crescente interesse em desenvolver novos materiais cicatrizantes e estudar os respectivos mecanismos de ação (RANZATO; MARTINOTTI; BURLANDO, 2011).

Muitos materiais são utilizados como curativos de feridas cutâneas com a finalidade de conter hemorragia, absorver o exsudato ou promover a cicatrização. No entanto, existem muito fatores a serem considerados na escolha do curativo correto: formação de uma barreira contra a entrada de micro-organismos, redução da dor durante a remoção, ausência de toxicidade e efeitos irritantes, eventual liberação de partículas e manutenção da temperatura e do pH da ferida (SOOD; GRANICK; TOMASELLI, 2014; ZHAO *et al.*, 2017).

Oligo e polissacarídeos são polímeros amplamente utilizados em aplicações biomédicas, na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (RATHINAMOORTHY; SASIKALA, 2011). O alginato é um polissacarídeo muito utilizado em curativos por ser altamente absorvente, não aderente, biodegradável e permitir a liberação de compostos ativos. Quando em contato com a ferida, um processo de interação iônica do alginato com o exsudato resulta na formação de um gel hidrofílico. O hidrogel mantém um ambiente úmido na ferida, absorve grande quantidade de exsudato e previne a contaminação microbiana (SOOD; GRANICK; TOMASELLI, 2014).

Os curativos de alginato de sódio ou cálcio permitem a incorporação de compostos ativos que podem apresentar efeito sinérgico no processo de cicatrização.

Muitas plantas medicinais são utilizadas por possuírem ação cicatrizante. O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011) inclui as seguintes formulações e extratos com essa propriedade: infusão das flores de *Calendula*

officinalis L. (calêndula), gel de *Caesalpinia ferrea* Mart. (jucá), extrato hidroalcoólico de *Symphytum officinale* L. (confrei), extrato glicólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Covillee (barbatimão) e o extrato glicólico da *Aloe vera* (babosa).

A babosa é uma planta suculenta que pertence à família *Liliaceae*. Dela é possível obter dois produtos distintos: o látex, conhecido como suco da babosa, e o gel, presente na parte interna das folhas, composto por células do parênquima responsável pelo armazenamento de nutrientes (DAT *et al.*, 2012).

Os compostos ativos presentes no gel de babosa apresentam inúmeras atividades biológicas como anti-inflamatória, antifúngica, antidiabética, antineoplásica e cicatrizante (REYNOLDS; DWECK, 1999; RAMACHANDRA; RAO, 2008; HAMMAN, 2008).

O presente trabalho descreve a obtenção de um filme de alginato contendo gel de babosa e a avaliação do seu efeito cicatrizante em lesões cirúrgicas na região dorsal de ratos Wistar.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e possui diversas funções como regular a temperatura corporal, servir de barreira contra agentes infecciosos, controlar a entrada e a saída de eletrólitos e armazenar uma grande quantidade de terminações nervosas. Ela é composta por duas camadas sobrepostas: a epiderme e a derme (Figura 1) (HARDING, 2004; WICKETT; VISSCHER, 2006; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

A epiderme é constituída principalmente por queratinócitos e protege o organismo contra desidratação e o atrito. A derme é composta por fibroblastos e pela matriz extracelular, sendo dividida em derme papilar superficial (tecido conjuntivo frouxo) e derme profunda papilar (tecido conjuntivo denso). Abaixo, em continuidade com a derme, está a hipoderme ou tecido subcutâneo, uma região bem vascularizada responsável pelo isolamento térmico e a absorção de choques mecânicos (PAUL; SHARMA, 2004; GOSAIN; DIPIETRO, 2004; BIELEFELD; AMINI-NIK; ALMAN, 2013).

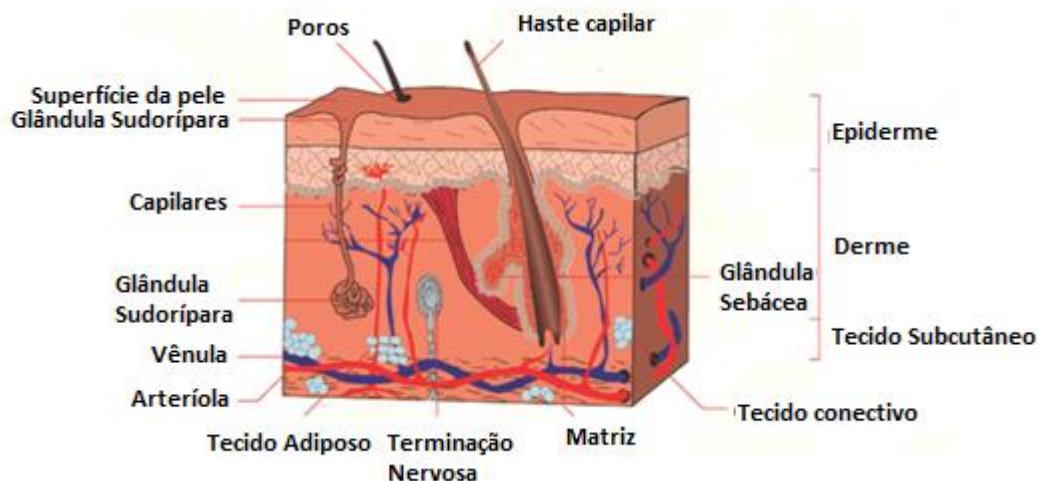


Figura 1. Estrutura da pele. Fonte: Mayet *et al.*, 2014 com modificações.

2.1.1 Epiderme

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado que funciona como uma barreira contra a perda de água e a entrada de micro-organismos (PAUL; SHARMA, 2004). Os queratinócitos presentes nessa camada

produzem a queratina, uma importante proteína estrutural. Além disso, a epiderme contém melanócitos, responsáveis pela produção de melanina (pigmento com função protetora contra os raios ultravioleta), células de Langerhans (importantes nas reações imunes) e as células de Merkel que são mecanorreceptores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; WICKETT; VISSCHER, 2006; BARONI *et al.*, 2012).

Observada da derme até a superfície, a epiderme possui cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A espessura e a estrutura da epiderme variam com o local, sendo mais espessas nas palmas das mãos e plantas dos pés (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; WICKETT; VISSCHER, 2006).

A camada basal é a mais profunda e delimita a junção derme-epiderme. Juntamente com a camada espinhosa, é responsável pela constante renovação da epiderme por sua intensa atividade mitótica. A camada espinhosa tem importante papel na resistência ao atrito devido à junção das células da epiderme. A camada granulosa possui os grânulos lamelares ricos em lipídeos que são liberados e incorporados à camada córnea, contribuindo para a formação de uma barreira impermeável a água e impedindo a desidratação. A camada lúcida está presente principalmente na pele espessa e é constituída por uma camada de células achatadas, cujos núcleos e organelas foram digeridos. A camada córnea, a mais superficial, é composta por células achatadas, mortas, sem núcleo, com citoplasma repleto de queratina e descama continuamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ELIAS; CHOI, 2005; DARLENSKI; KAZANDJIEVA; TSANKOV, 2011).

2.1.2 Derme

A derme, situada abaixo da epiderme, é formada por um tecido conjuntivo composto por fibras nervosas, colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (GAGs) que contribuem para a integridade mecânica e elástica da pele (EHRENREICH; RUSZCZAK, 2006; THEORET, 2009).

A derme é dividida em duas camadas: papilar e reticular. A camada papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo, formando as papilas dérmicas que mantém o contato com a epiderme e pequenos vasos sanguíneos que são responsáveis pela oxigenação e nutrição da epiderme. A camada reticular é mais espessa, composta

por tecido conjuntivo denso (fibroblastos e feixes de fibras colágenas e elásticas) Além dos vasos sanguíneos e linfáticos, também são encontrados na derme os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os fibroblastos sintetizam as principais proteínas que constituem o tecido conectivo da derme: o colágeno e a fibronectina. A camada próxima da epiderme (derme papilar) possui fibras finas de colágeno, enquanto a derme reticular é composta por fibras densas que recobrem a camada adiposa. Os diferentes tipos de colágeno presentes na derme podem ser visualizados utilizando diferentes métodos, incluindo a coloração histoquímica clássica (WATT; FUJIWARA, 2011).

2.1.3 Hipoderme

A hipoderme é uma camada formada por tecido conjuntivo frouxo responsável pelo isolamento térmico e absorção de choques mecânicos devido à presença de células que realizam o armazenamento de gordura. Dependendo da nutrição e do local, a hipoderme pode ter uma camada de tecido adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.2 Lesão cutânea

A integridade da pele pode ser comprometida por traumas, cortes e cirurgias. Uma ferida se forma quando a epiderme é lesionada, expondo as camadas inferiores ao meio externo. Dependendo da profundidade da lesão, podem ser expostos fibroblastos, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, cartilagem e osso (HENG, 2011; EHRENREICH; RUSZCZAK, 2006).

As lesões que afetam somente a epiderme são chamadas de superficiais, enquanto as que envolvem camadas profundas da derme, incluindo vasos sanguíneos, glândulas e folículos pilosos são denominadas parciais. As feridas de comprometimento total ocorrem quando são lesadas as camadas mais profundas, além da derme (BOATENG; CATANZANO, 2015).

Quando um tecido é lesado, o organismo se encarrega da regeneração. A velocidade da reparação depende do tamanho da lesão e, para que ocorra, vários mecanismos precisam ser ativados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O processo de cicatrização envolve diferentes sistemas biológicos que respondem simultaneamente (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008). A cicatrização de feridas cutâneas é um processo complexo que envolve coagulação, recrutamento de leucócitos, inflamação, deposição da matriz extracelular e epitelização (Figura 2) (GURTNER *et al.*, 2008; CORSETTI *et al.*, 2010; ASHCROFT *et al.*, 2011).

As feridas resultam em um processo inflamatório, ocasionando alguns sinais e sintomas como vermelhidão, dor, calor e edema do tecido circundante (SCHMIDT *et al.*, 2009).

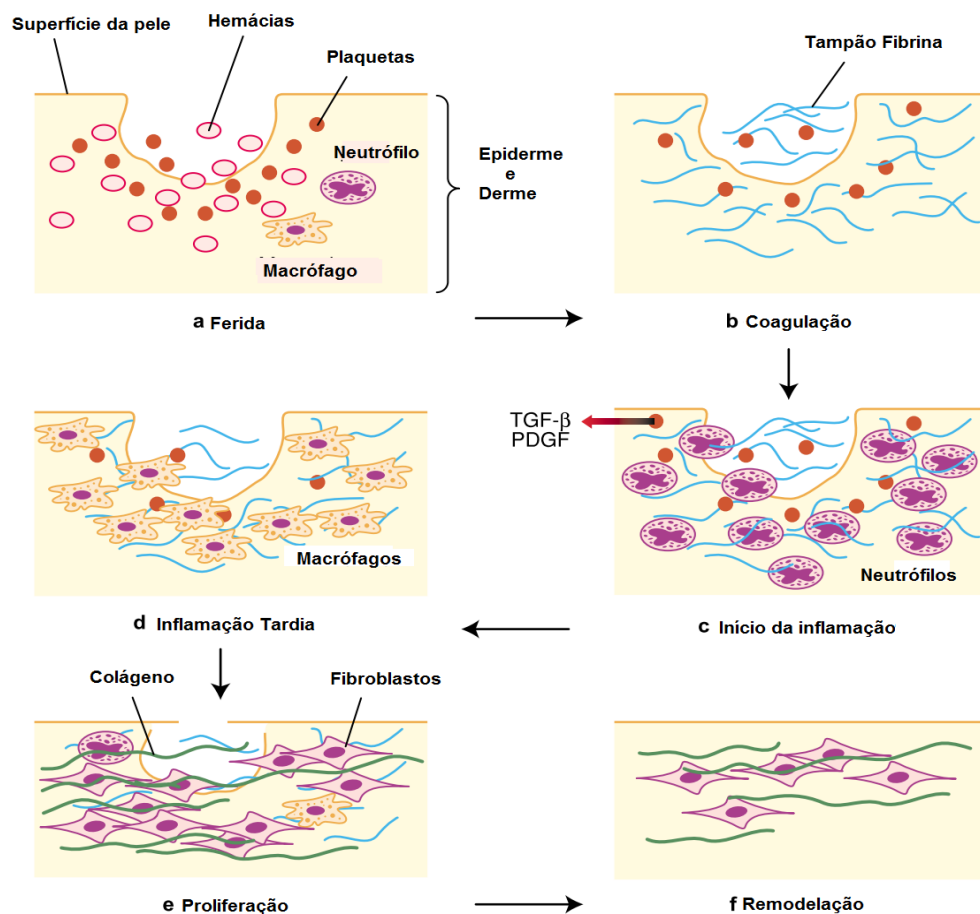


Figura 2. Etapas da cicatrização: (a) logo após a lesão, ocorre extravasamento de sangue, agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação (b) formação de um tampão rico em fibrina (c) as plaquetas liberam mediadores químicos que atraem neutrófilos (células fagocíticas) sinalizando o início da inflamação (d) os neutrófilos começam a ser substituídos por macrófagos que além de fagocitar restos celulares, liberam fatores de crescimento e iniciam a fase proliferativa (e) angiogênese aumentada e síntese de colágeno (f) restabelecimento da integridade da pele. Fonte: Beanes *et al.*, 2003 com modificações.

2.2.1 Hemostase

A lesão inicial leva a uma ruptura do endotélio vascular, o que resulta no extravasamento de sangue e, conseqüentemente, a ativação de plaquetas (JANIS; HARRISON, 2014). Em um primeiro momento, ocorre uma vasoconstrição e o tamponamento do vaso, com a formação de um trombo provisório resultante da adesão plaquetária. As plaquetas presentes no coágulo são importantes para a resposta inflamatória, pois liberam uma série de substâncias (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de necrose tumoral β (TNF- β) e fator plaquetário IV) que atraem e ativam fibroblastos, células endoteliais e macrófagos (ENOCH; LEAPER, 2007). Além disso, as plaquetas liberam aminas vasoativas, como a serotonina, que causam vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular, permitindo o influxo de células importantes no processo de cicatrização (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006).

O tampão plaquetário formado desempenha a função de uma matriz provisória para a migração celular (monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais) ao local da lesão (HART, 2002; RAMOS; PIMENTEL, 2011). Além disso, o coágulo impede a perda de fluido e eletrólitos pela ferida, estabelece uma barreira contra contaminações externas e permite a continuidade do processo de cicatrização (MONACO; LAWRENCE, 2003).

2.2.2 Inflamação

A resposta inflamatória é desencadeada pela liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios pelos capilares e o tecido lesado (STRODTBECK, 2001). As principais células envolvidas no processo inflamatório são neutrófilos e macrófagos. A mudança nas condições hemodinâmicas durante o processo inflamatório permite uma redistribuição leucocitária ao longo da parede endotelial, processo chamado de marginalização (ROBINS & COTRAN, 2016).

O processo de recrutamento de leucócitos para o local da lesão envolve as seguintes etapas: marginalização, rolagem, ligação ao endotélio, transmigração e migração em direção aos estímulos quimiotáticos. Essas etapas são influenciadas por mediadores químicos. As moléculas de adesão expressas na superfície do

endotélio e dos leucócitos, chamadas selectinas, ligam-se aos açúcares e permitem a rolagem, a aderência e a transmigração. Os leucócitos em rolagem reconhecem as mudanças no endotélio e iniciam a etapa de adesão às células endoteliais, mediada pelas integrinas. Após aderir na superfície endotelial, atravessam a parede do vaso por meio das junções intercelulares, processo chamado diapedese, e então, migram em direção ao local da lesão por meio do gradiente químico (quimiotaxia) (MONACO; LAWRENCE, 2003; ROBINS & COTRAN, 2016).

A migração dos leucócitos é estimulada por produtos de degradação de colágeno e elastina, fatores do complemento e fatores imunomodulatórios como TGF- β (fator de crescimento transformante – β), TNF- α (fator de necrose tumoral – α), IL-1 (interleucina-1) e PDGF. Os neutrófilos secretam citocinas pró-inflamatórias, iniciam a fagocitose de partículas estranhas e o desbridamento do tecido lesado por meio de enzimas proteolíticas (HENG, 2011; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009; ROBINS & COTRAN, 2016). Uma vez que toda contaminação tenha sido removida, a atividade dos neutrófilos muda gradualmente dentro de alguns dias e, então, entram em processo de apoptose (HART, 2002).

Os monócitos presentes no sangue periférico infiltram-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos tanto no início quanto durante o processo de cicatrização (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). Esses monócitos são rapidamente ativados em macrófagos teciduais (JANIS; HARRISON, 2014).

Os macrófagos são as principais células efetoras do reparo tecidual, removendo componentes do tecido conjuntivo danificado (colágeno, elastina e proteoglicanos) (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). Além de fagocitar restos celulares, os macrófagos desempenham um importante papel no processo de cicatrização ao estimular a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, bem como a angiogênese, iniciando a fase proliferativa (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008; GUO; DIPIETRO, 2010; JANIS; HARRISON, 2014).

2.2.3 Proliferação tecidual

A fase de formação tecidual caracteriza-se pelo restabelecimento da integridade da epiderme e da derme (BEANES *et al.*, 2003). A fase proliferativa é constituída pelas seguintes etapas: deposição de colágeno, angiogênese, formação

do tecido de granulação e epitelização. A progressão da proliferação tecidual estimula a substituição da matriz provisória de fibrina pelo tecido de granulação, que protege a região lesionada, formando uma barreira contra infecções e promovendo um ambiente adequado para a epitelização. Esse tecido contém miofibroblastos que são importantes para a contração da ferida (HOSGOOD, 2006; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; ARWERT; HOSTE; WATT, 2012).

Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. O microambiente quente e úmido do ferimento também facilita a proliferação celular. Além disso, o exsudato é rico em citocinas que estimulam o crescimento de novos tecidos (STRODTBECK, 2001).

2.2.4 Angiogênese

A angiogênese é um processo dinâmico regulado por fatores produzidos em resposta à lesão tecidual e necessária à formação do tecido de granulação. Ocorre na matriz extracelular do leito da ferida devido ao estímulo mitogênico das células endoteliais (ARNOLD; WEST, 1991; RISAU, 1997; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). Esse processo envolve a formação de células endoteliais com paredes finas a partir de vasos pré-existentes (JANIS; HARRISON, 2014).

O início da neovascularização depende de fatores quimiotáticos das células vizinhas e da matriz extracelular. A proliferação das células endoteliais é considerada um efeito secundário ao movimento de migração estimulada por alguns fatores como fibronectina e fatores derivados de plaquetas. As células endoteliais tem um importante papel no processo de cicatrização, uma vez que permitem a migração de leucócitos, o transporte de nutrientes e oxigênio e a secreção de substâncias ativas (fator de crescimento endotelial vascular, TGF- α (fator de crescimento transformante – α), TGF- β e PDGF) (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). A baixa tensão de oxigênio pode estimular a angiogênese através da produção de mediadores como VEGF (fator de crescimento vascular) (DETMAR *et al.*, 1997).

2.2.5 Síntese de colágeno

O colágeno constitui a maior família de proteínas do organismo. Alguns mediadores como PDGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), TGF- β , IL-1,

TNF- α induzem a síntese de colágeno pelos fibroblastos (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008). Uma vez que o tampão provisório é desprovido dessas células, os processos de migração e proliferação, com consequente produção da matriz extracelular são essenciais na regeneração do tecido lesado (BAUM *et al.*, 2005; CORSETTI *et al.*, 2010; MESTRE; RODRIGUES; CARDOSO, 2012).

Os componentes da matriz extracelular participam da junção celular e regulam a proliferação, a migração e a diferenciação de células. A matriz extracelular é composta por proteínas (colágeno e elastina) e uma matriz intersticial constituída por glicoproteínas adesivas incorporadas ao gel de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (ENOCH; LEAPER, 2007).

O colágeno apresenta estrutura helicoidal formada por três proteínas de cadeia alfa capazes de se entrelaçarem em consequência da presença de uma molécula de glicina na terceira posição de cada polipeptídeo (ENOCH; LEAPER, 2007).

Há vários tipos de colágeno que estão relacionados a diferentes tecidos e funções biológicas. O colágeno tipo I está presente principalmente nos ossos e tendões. O tipo III, juntamente com o tipo I, está presente nos vasos sanguíneos, derme e fascia. A derme contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20% do tipo III. Em lesões cutâneas, os fibroblastos produzem principalmente colágenos dos tipos I e III (ROBSON; STEED; FRANZ, 2001; BEANES *et al.*, 2003). O colágeno tipo III, abundante nos vasos sanguíneos, está associado com a capilaridade do tecido de granulação e, com a progressão da cicatrização, é substituído por colágeno tipo I (HOSGOOD, 2006).

Após a deposição da MEC, inicia-se o processo de contração da ferida. O mecanismo mais aceito envolve a atividade dos miofibroblastos, células derivadas dos fibroblastos, que tem capacidade de contração semelhante àsquelas encontradas no músculo liso. Após o fechamento da ferida, os miofibroblastos sofrem apoptose e uma cicatriz é formada (RAMASASTRY, 2005; STOJADINOVIC *et al.*, 2008).

2.2.6 Re-epitelização

Na etapa de re-epitelização, ocorre um aumento acentuado da atividade mitótica das células epiteliais das bordas das feridas. A epitelização requer um

ambiente úmido com nutrição adequada e controle da contaminação microbiana. Essa fase é modulada pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) e FGF (MESTRE; RODRIGUES; CARDOSO, 2012; ENOCH; LEAPER, 2007).

A epitelização é iniciada pela ativação e migração dos queratinócitos presentes na borda da ferida, assim como de apêndices dérmicos, folículos pilosos e glândulas sebáceas (JANIS; HARRISON, 2014). A migração dos queratinócitos é precedida por algumas modificações estruturais, como a reorganização de filamentos de queratina que alteram a forma, a adesão e a polimerização dos filamentos de actina na periferia celular (GABBIANI; CHAPONNIER; HUITNER, 1978; PALADINI *et al.*, 1996). Esse processo é facilitado pela perda de adesão de células epidérmicas e dérmicas com a membrana basal, induzida por collagenases e metaloproteinases (PILCHER *et al.*, 1997).

O caminho da migração dos queratinócitos é determinado pela expressão de integrinas na membrana que permitem a interação com diversas proteínas da matriz extracelular (fibronectina, tenascina e fibrinogênio) que estão intercaladas com colágeno tipo I na margem da ferida. As células epidérmicas voltam à forma normal e tornam-se firmemente ligadas à membrana basal e à derme subjacente. Com o passar do tempo, a camada epidérmica sofre estratificações (HYNES, 1992; CLARK *et al.*, 1996).

2.2.7 Remodelação tecidual

Nessa fase, ocorre alteração na matriz extracelular pela deposição de proteoglicanos e colágeno. A maioria dos vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida por processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos de morte celular (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

O processo de cicatrização consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a re-epitelização e a reconstituição do tecido (FALEIRO *et al.*, 2009). A adequada cicatrização de uma ferida ocorre quando não há contaminação microbiana e a formação do tecido cicatricial é mínima, com limitada produção de tecido necrótico (MAYET *et al.*, 2014).

2.3 Feridas

Há diferentes classificações das feridas cutâneas baseadas na profundidade da lesão, na natureza da cicatrização e na perda tecidual. Esses fatores tem um efeito significativo sobre a cicatrização.

De acordo com a profundidade da lesão, as feridas podem ser classificadas em superficiais, profundas ou totais. As superficiais envolvem somente a epiderme e a derme papilar e não há formação de cicatriz. As lesões dérmicas profundas, por sua vez, apresentam contração e cicatriz. Esse tipo de ferida demora de 10 a 21 dias para se curar. As totais ocorrem em incisões cirúrgicas que são fechadas por suturas (PERCIVAL, 2002).

De acordo com a natureza do processo de cicatrização, as feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. As feridas agudas são geralmente lesões que se curam completamente, com a formação de pequenas cicatrizes dentro de um prazo de 8 a 12 semanas. As principais causas da inflamação aguda são as lesões mecânicas (perfuração, arranhões e cirurgias), radiação, eletricidade e produtos químicos corrosivos e queimaduras (BOATENG; CATANZANO, 2015).

Feridas crônicas são resultantes de lesões que não se curam espontaneamente dentro de três meses e são complexas. A maioria dessas feridas é contaminada e envolve a perda significativa do tecido; além disso, podem estar relacionadas com outros fatores como diabetes, infecções persistentes, deficiência nutricional, vasculites e tratamento primário incorreto (MOORE *et al.*, 2006).

As feridas podem cicatrizar por três diferentes formas dependendo da perda de tecido e a presença ou não de infecção: primeira, segunda ou terceira intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre quando as bordas são aproximadas como acontece em suturas cirúrgicas. Não há perda excessiva de tecido nem a presença de contaminação. Na cicatrização por segunda intenção, ocorre perda excessiva de tecido, as feridas são deixadas abertas e se fecham por contração e epitelização. Na cicatrização por terceira intenção, a aproximação das margens da ferida por suturação é feita após tratamento da infecção (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Quando a pele é danificada, os capilares se tornam permeáveis, permitindo a passagem de líquido ao redor da ferida. Esse fluido, chamado exsudato, é rico em

proteínas, nutrientes, células epiteliais, eletrólitos, mediadores inflamatórios, enzimas e fatores de crescimento (CUTTING, 2004). O fluido de feridas agudas contém substâncias endógenas, células epiteliais e fibroblastos que aumentam a velocidade e a qualidade da cicatrização (MENAKER, 2001). O volume de exsudato produzido varia tanto nos diferentes estágios da cicatrização como nos tipos de feridas, dependendo da origem, localização e do tamanho da lesão (CUTTING, 2004).

2.4 Curativos

Os curativos são dispositivos utilizados com finalidade de limpeza, proteção e absorção do exsudato (SMANIOTTO *et al.*, 2010). A principal função de um curativo é promover um ambiente ideal para a cicatrização (RAMASASTRY; 2005). Os materiais que constituem os curativos devem absorver o excesso de exsudato da ferida para reduzir o risco de proliferação bacteriana, não conter fibras ou fragmentos que possam se soltar induzindo uma reação imunológica, manter um ambiente úmido e causar danos mínimos ao tecido de granulação quando removidos (MENAKER, 2001; JAYAKUMAR *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2017).

A manutenção de um ambiente úmido auxilia na cicatrização de várias maneiras: impede o ressecamento do tecido, promove atividade de enzimas que degradam detritos celulares e facilita a migração de queratinócitos. O equilíbrio da tensão de oxigênio é necessário para que ocorra uma cicatrização correta, uma vez que as células necessitam do oxigênio para migração e mitose, enquanto a hipóxia acelera a angiogênese. Além disso, a migração de células epidérmicas é inibida em níveis elevados de oxigênio (MENAKER, 2001).

Os materiais mais utilizados no tratamento de feridas como gaze, algodão e bandagem são estruturalmente simples e não estimulam o processo de cicatrização. Nos últimos anos, o tratamento de feridas evoluiu em consequência da compreensão das alterações celulares e moleculares que ocorrem no processo de regeneração. A capacidade de reparação da pele após uma pequena lesão é notável; no entanto, quando a lesão afeta uma grande área, a cobertura imediata da ferida com um curativo adequado é essencial para acelerar a cicatrização (MAYET *et al.*, 2014).

O tratamento de feridas cutâneas inclui métodos clínicos e curativos. O tipo de tratamento depende da evolução das fases da cicatrização, enquanto que a escolha do curativo depende de sua ação, determinada pelas suas características e composição (FRANCO; GONÇALVES, 2008). Outros fatores que devem ser levados em consideração na escolha do curativo são o local da ferida e o nível de exsudato.

Os curativos comerciais disponíveis para o tratamento de lesões cutâneas são geralmente compostos por filmes semipermeáveis, filmes não aderentes, hidrocolóides, alginatos, espumas, hidrogéis, curativos contendo antimicrobianos e filmes de poliuretano (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011).

Há pesquisas de processos tecnológicos para obtenção de curativos que possuam características diferenciadas. Polímeros naturais, polissacarídeos e proteínas estão sendo utilizados no desenvolvimento de novos curativos porque apresentam adequadas disponibilidade e biodegradabilidade, além de alguma atividade biológica (YUDANOVA; RESHETOV, 2006). Entre os polissacarídeos utilizados na fabricação de curativos estão o alginato e a quitosana (HAMMAN, 2008).

A quitosana é um polissacarídeo abundante na natureza, obtido de carapaça de crustáceos como o caranguejo e o camarão. Os curativos à base de quitosana podem ser fabricados em várias formas, incluindo membranas, esponjas e géis (KHOR; LIM, 2003).

Os curativos hidrocolóides são confeccionados com gelatina, pectina e carboximetilcelulose sódica; substâncias capazes de formar um gel, promovendo o desbridamento da lesão, protegendo a ferida e diminuindo a dor nos momentos da aplicação e remoção. O gel produz um gradiente de absorção para compostos solúveis no exsudato, permitindo assim a remoção de componentes tóxicos resultantes da destruição celular e bacteriana (ODA, 2004; RAMASASTRY; 2005).

Outro polissacarídeo muito utilizado no tratamento de feridas é o alginato, um composto natural, comumente utilizado pela indústria farmacêutica (CHAN; LEE; HENG, 2002).

2.5 Alginato

O alginato é um polissacarídeo extraído principalmente de algas marrons (MAURSTAD *et al.*, 2008). Pode ser isolado também de bactérias como *Azotobacter vinelandii* e várias espécies de *Pseudomonas*. No entanto, a produção por fermentação não é economicamente viável (DRAGET; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 2005).

O alginato é um polímero aniônico que possui duas diferentes unidades de ácidos urônicos repetitivas, (1,4)- α -L-guluronato (unidade G) e (1,4)- β -D-manuronato (unidade M), em variadas quantidades e arranjos sequenciais (Figura 3) (SUN; TAN, 2013). A proporção e a distribuição dos blocos G e M resultam em diferenças nas propriedades físicas do alginato (MAURSTAD *et al.*, 2008).

As diferenças das ligações entre os blocos M e G é resultado da conformação desses blocos na cadeia do polímero (AMSDEN; TURNER, 1999). Especificamente, o bloco G se dobra, enquanto o M tem uma forma conhecida como fita estendida. A ligação de dois blocos G seguidos forma um orifício que tem dimensões ideais para a interação com íons (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

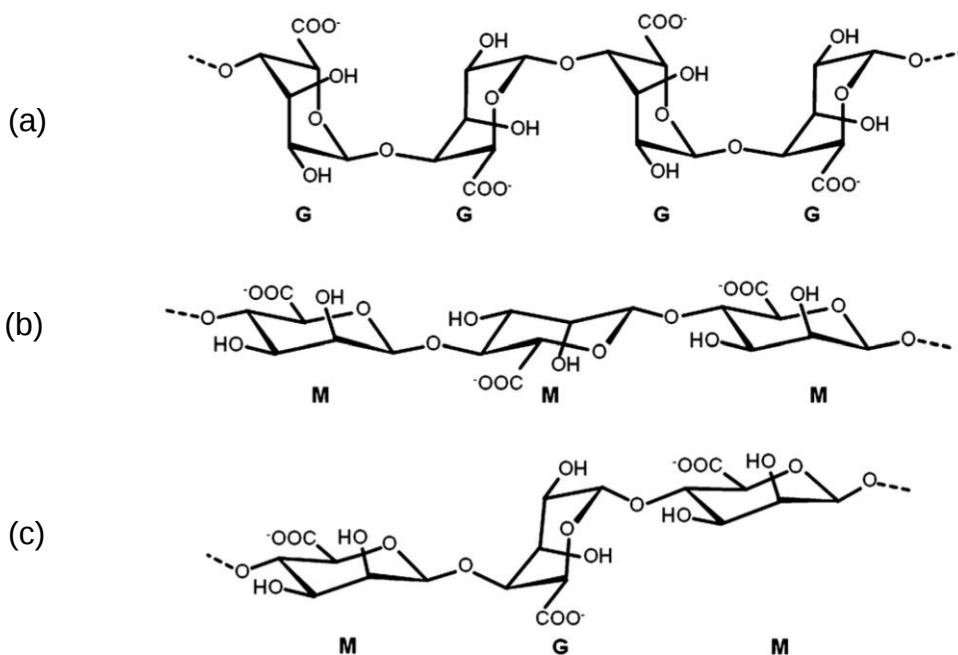


Figura 3. Estruturas moleculares de sequências de subunidades de ácido gulurônico e ácido manurônico (a) bloco G, b) bloco M e c) bloco MG . Fonte: LEE; MOONEY, 2012.

O alginato é utilizado em vários setores industriais por possuir propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de gelificação, emulsificação, formação de hidrogéis e baixa toxicidade (KHOTIMCHENKO *et al.*, 2001; KNILL *et al.*, 2004). Na indústria alimentícia, o alginato é adicionado como espessante em xaropes e coberturas. No setor farmacêutico, tem emprego como desintegrante de comprimidos, componente de curativos de feridas cutâneas e formulações para o tratamento do refluxo gástrico (McHUGH, 2003).

Vários derivados do alginato têm aplicações biomédicas pela versatilidade dos produtos em formarem estruturas como filmes, partículas, géis e microesferas de liberação prolongada (LEE; MOONEY, 2012; LEONARD *et al.*, 2004).

A propriedade mais importante do alginato é a sua capacidade de formar hidrogéis (GEORGE; ABRAHAM, 2006). Um hidrogel é uma rede de ligações cruzadas de polímeros hidrofílicos que consegue absorver uma grande quantidade de água sem sofrer alteração e, como consequência, apresenta inúmeras vantagens quando utilizados como curativos cutâneos (GUPTA; VERMANI; GARG, 2002).

Uma das técnicas mais utilizadas para a obtenção de filmes de alginato é chamada de “*casting*”, na qual uma solução filmogênica, colocada em um molde, é submetida à secagem em temperatura controlada (THARANATHAN, 2003).

Hidrogéis de alginato podem ser obtidos por diferentes técnicas. A mais comum é a troca iônica, onde cátions divalentes presentes em uma solução aquosa formam ligações cruzadas com as estruturas dos blocos G do polímero (LEE; MOONEY, 2012). A escolha dos íons, a composição e a estrutura do alginato são fatores importantes, uma vez que podem influenciar as propriedades das ligações cruzadas (MORCH *et al.*, 2006). A taxa de gelificação é um fator fundamental, pois controla a uniformidade e a resistência do filme, características importantes para as diferentes aplicações biomédicas (KUO; MA, 2001).

Vários íons divalentes podem ser utilizados na formação de ligações cruzadas entre as moléculas do alginato, processo conhecido como reticulação. A afinidade desse polímero por íons diminui de acordo com a sequência dos elementos químicos: $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (HAUG; SMIDSRØD, 1970). O íon Ca^{2+} é o mais utilizado pela simplicidade das condições reacionais e à

baixa toxicidade (NUNAMAKER; PURCELL; KIPKE, 2007). A solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) é a mais usual, no entanto, leva a uma rápida gelificação, resultante da elevada solubilidade deste sal em água (LEE; MOONEY, 2012). Para retardar o processo de gelificação, o CaCl_2 pode ser substituído por CaSO_4 ou CaCO_3 , que possuem menor solubilidade aquosa (NUNAMAKER; PURCELL; KIPKE, 2007; SUN; TAN, 2013).

A capacidade de formar hidrogéis na presença de íons divalentes é fundamental para as diferentes funções biológicas e aplicações tecnológicas do alginato. As interações com íons divalentes formam zonas de junções conhecidas popularmente como “egg box” ou modelo da “caixa de ovos”. Nessa conformação estrutural, as cadeias helicoidais englobam os íons como mostrado na Figura 4 (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

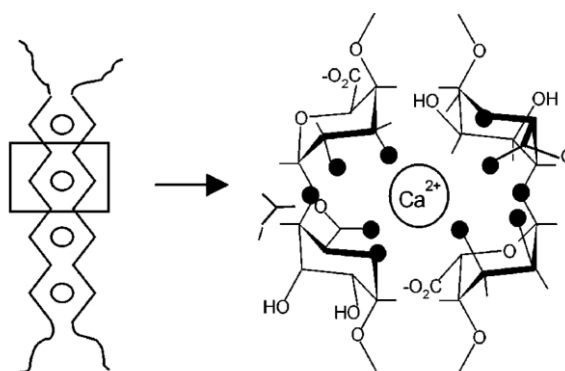


Figura 4. Ilustração esquemática do modelo “caixa de ovos” com a zona de junção do íon Ca^{2+} com o alginato. Fonte: BRACCINI; PÉREZ, 2001.

O processo de reticulação pode ser realizado por dois métodos. No primeiro, a solução reticuladora pode ser adicionada durante o preparo do filme. No entanto, estudos mostraram que os filmes podem se tornar frágeis, não homogêneos, opacos e solúveis em água. No segundo, os filmes já formados são mergulhados na solução reticuladora, tornando-os mais resistentes e menos solúveis em água. A concentração e o tempo de exposição à solução iônica podem influenciar as propriedades físico-químicas do filme (PAVLATH *et al.*, 1999; RHIM, 2004).

O íon cálcio participa de funções fisiológicas importantes no organismo como: cardiovascular, contração muscular, atividade neuronal e cicatrização (LANSDOWN, 2002). Quando o alginato de cálcio é aplicado numa ferida, o sódio presente no exsudato é trocado pelo cálcio do curativo, promovendo o desbridamento do tecido e

a formação de um gel que mantém o ambiente favorável à cicatrização e permite a troca do curativo sem causar dor. Além disso, o cálcio induz a hemostasia e participa da cascata de coagulação (BARNETT; VARLEY, 1987; LANSDOWN, 2002; FRANCO; GONÇALVES, 2008).

A desidratação durante o processo de secagem utilizado na técnica “*casting*”, produz filmes quebradiços, o que leva à necessidade da adição de um agente plastificante. O plastificante causa uma diminuição das forças intermoleculares ao longo das cadeias do polímero, melhorando a flexibilidade e a maleabilidade do filme (VIEIRA *et al.*, 2011).

A compatibilidade entre o agente plastificante e o biopolímero é muito importante e fatores como formação de ligações de hidrogênio e a solubilidade devem ser considerados (CHOI; PARK, 2004). Compostos de menor tamanho, alta polaridade e maior distância entre os grupos polares apresentam melhores efeitos plastificantes em sistemas poliméricos (CAO; YANG; FU, 2009).

Os agentes plastificantes mais utilizados em biofilmes são os polióis (glicerol, sorbitol e polietilenoglicol), os monossacarídeos (glicose, manose e frutose), lipídeos (ácidos graxos) e tensoativos (CHENG; KARIM; SEOW, 2006; ZHANG; HAN, 2006; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2007; BERGO *et al.*, 2008; GALDEANO *et al.*, 2009; ROTTA *et al.*, 2009).

Os polióis são considerados os mais eficazes para utilização em polímeros hidrofílicos. O glicerol, mais conhecido como glicerina, é incorporado na maioria das soluções de hidrocolóides e de alginato por ser altamente higroscópico e evitar a fragilidade dos filmes (KRISTO; BILIADERIS, 2006; ZHANG; HAN, 2006).

2.6 *Aloe vera* (L.) Burm. f.

Aloe vera (L.) Burm. f. é uma planta pertencente à família *Xanthorrhoeaceae*, que abrange mais de 300 espécies (RAMOS; PIMENTEL, 2011). No Brasil, é popularmente conhecida como babosa, nome oriundo da consistência viscosa (baba) da mucilagem contida nas folhas (BACH; LOPES, 2007).

Aloe vera é uma planta xerófila, ou seja, se adapta a climas secos e necessita de pouca quantidade de água para sobreviver, podendo ser encontrada em solos

salinos e praias. É cultivada nos Estados Unidos, México, Índia, América do Sul e Central, África, Austrália e Irã (MOGHADDASI; VERMA, 2011).

Do ponto de vista morfoanatômico, a babosa é uma planta com caule curto e raízes abundantes e longas. As folhas aparecem no nível do solo, são grossas, carnosas e atingem de 30 a 60 cm de comprimento (Figura 5). A face ventral da folha é lisa, enquanto a dorsal é convexa, lisa e serosa (GRINDLAY; REYNOLDS, 1986).



Figura 5. *Aloe vera* (L.) Burm. f. Fonte: O autor.

As flores da babosa são pendentes, com 2 a 3 cm de comprimento. A inflorescência é central, ereta, com 1 a 1,5 metros de altura, sustentada por um pedúnculo (Figura 6) (GRINDLAY; REYNOLDS, 1986). Essa haste central apresenta uma espiga densa de flores amarelo-alaranjadas que produzem frutos ovoides, contendo sementes aladas (PARENTE *et al.*, 2013).



Figura 6. *Aloe vera* (L.) Burm. f. com inflorescência. Fonte: O autor.

A babosa é utilizada de diversas formas e em diferentes setores. O seu emprego pode requerer o esmagamento, a moagem ou a prensagem para retirada do suco ou a extração do gel sem triturar as folhas. Na área alimentícia, tem sido utilizada como alimento funcional, especialmente no preparo de bebidas. Na indústria farmacêutica, é adicionada em cápsulas, comprimidos, pomadas e géis. Em produtos de higiene e beleza, pode ser adicionada em cosméticos, sabonetes, cremes e loções (RAMACHANDRA; RAO, 2008; HAMMAN, 2008).

Os compostos ativos da babosa apresentam efeitos analgésico, cicatrizante, anti-inflamatório, laxativo, antioxidante, antineoplásico, antimicrobiano e antiviral (SYED *et al.*, 1996; DAS *et al.*, 2011; FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014). Os dois principais produtos extraídos da planta são o látex e o gel. O látex é o exsudato amarelo e amargo, presente nos túbulos pericíclicos da parte exterior das folhas, constituído principalmente por derivados hidroxiantracênicos, como aloína A e B, conhecidos por suas propriedades laxativas (SACCU; BOGONI; PROCIDA, 2001; BOZZI *et al.*, 2007).

O gel da babosa, presente no interior das folhas, é composto de aproximadamente 98,5% de água e contem taninos, saponinas, terpenos, flavonoides e esteroides (SATHYAPRABHA *et al.*, 2010).

O gel é rico em compostos fenólicos e polissacarídeos (VEGA *et al.*, 2005). As cromonas, isoaloeresina D e neoaloesina A, são compostos com atividade anti-

inflamatória e antibiótica. Ainda podem ser encontrados no gel, vitaminas (ácido fólico, vitaminas B₁, B₂, α -tocoferol e β -caroteno), elementos inorgânicos (cálcio, ferro, magnésio, manganês e sódio) e esteróis (β -sitosterol, colesterol e campesterol) (HAMMAN, 2008; RAHMAN; CARTER; BHATTARAI, 2017).

Os polissacarídeos da babosa são, em grande parte, glucomananas em variadas composições. As mananas acetiladas, como a acemanana, possuem atividade biológica (FEMENIA *et al.*, 1999; DAGNE *et al.*, 2000; CHOI; CHUNG, 2003; NI *et al.*, 2004; HAMMAN, 2008).

A acemanana é o principal polissacarídeo encontrado na babosa. É solúvel em água e sua estrutura química é constituída por unidades de glicose e manose acetiladas unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas (Figura 7). Essa manana acetilada desempenha um importante papel no processo de cicatrização ao inibir o crescimento microbiano e estimular a atividade dos macrófagos (PEREIRA; MENDES, BARTOLO, 2013).

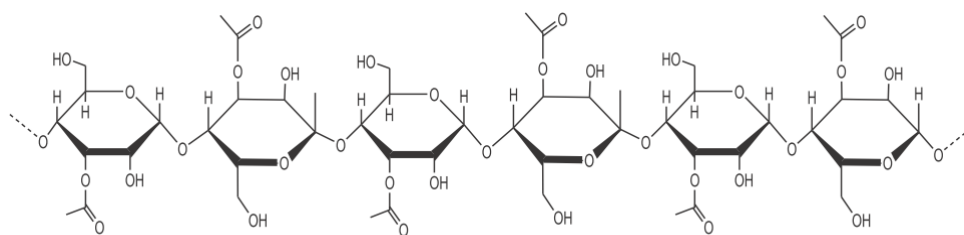


Figura 7. Estrutura química de unidades do polissacarídeo acemanana. Fonte: Pereira *et al.*, 2013.

Os tipos e quantidades dos compostos presentes no gel da babosa podem variar de acordo com a origem geográfica, o clima e a espécie (CHOI; CHUNG, 2003).

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito da reticulação nas propriedades físico-químicas de filmes de alginato-babosa;

Estudar o efeito cicatrizante dos filmes de alginato-babosa em lesões cirúrgicas na região dorsal de ratos Wistar;

Avaliar as alterações histológicas (infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia) nos tecidos das lesões tratadas com filmes de alginato-babosa.

4. Materiais e Métodos

4.1 Coleta do material vegetal e extração do gel

As folhas de babosa foram coletadas no mês de Setembro de uma planta da espécie *Aloe vera* cultivada no horto da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O gel foi extraído por retirada da casca e armazenado em recipientes herméticos a -4°C até o momento do preparo dos filmes.

4.2 Preparo e reticulação dos filmes*

Para os ensaios de avaliação físico-química foram obtidos filmes de alginato de sódio contendo gel de babosa e glicerina não reticulados e reticulados com CaCl_2 . Para os testes “*in vivo*” foram preparados filmes de alginato de sódio contendo plastificante com e sem adição do gel de babosa, ambos reticulados.

4.3 Análises físico-químicas dos filmes

4.3.1 Espectroscopia no infravermelho

O alginato de sódio (pó), o filme controle (sem adição de babosa e sem reticulação) e o filme com gel de babosa reticulado foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando espectrofotômetro Shimadzu Prestig 21 com varredura entre 4000 a 400 cm^{-1} . As principais bandas apresentadas no espectro foram correlacionadas com os grupos químicos das estruturas dos compostos.

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As estruturas dos filmes alginato-babosa reticulado e sem reticulação foram caracterizadas por MEV utilizando equipamento VeGa 3 Tescan em tensão de aceleração 10,0 Kv, distância de 14,85 mm e magnitude de 1000 X. Antes da análise, o filme foi coberto com uma fina camada de ouro por *sputtering* e dispostos a máxima distância do alvo para evitar danos à superfície.

*Obs.: Por motivos de solicitação de registro de patente, os detalhes experimentais da obtenção dos filmes foram omitidos.

4.3.3 Ensaio de resistência mecânica à tração

O ensaio de tração foi realizado em máquina de ensaio servo-elétrica Shimadzu® AG-I com filmes alginato-babosa reticulado e sem reticulação de 13,6 x 25 mm, espessura de 25 μm e velocidade do teste de 5 mm min⁻¹.

4.3.4 Ensaio de liberação de cálcio do filme alginato-babosa reticulado

Uma amostra do filme alginato-babosa reticulado (500 mg) foi colocada em um béquer contendo 20 mL de água deionizada. O béquer foi mantido em banho termostático a 37°C. Alíquotas de 2 mL foram retiradas após 5, 30, 60 e 90 minutos e posteriormente analisadas por absorção atômica. As alíquotas de 2 mL de água deionizada foram repostas a cada coleta. A leitura foi realizada com um espectrofotômetro de absorção atômica Varian AA240FS com lâmpada de catodo oco de 10 MA. A leitura foi feita em 422,7 nm e o resultado expresso em ppm.

4.3.5 Hidratação do filme alginato-babosa

O teste de hidratação foi realizado com fragmentos do filme alginato-babosa reticulado (discos com 1 cm de diâmetro), mantidos em uma cesta de inox mergulhada em 20 mL de água destilada a 37°C. O fragmento do filme foi pesado antes do início do ensaio e novamente em 10, 20, 30, 60 e 120 minutos, após remoção do excesso de água. As determinações foram realizadas em triplicata para cada intervalo de tempo.

4.3.6 Ensaio de quantificação e liberação de polissacarídeos

A quantificação de polissacarídeos foi realizada com amostras do gel de babosa “in natura”, gel após o degelo e do filme de alginato-babosa reticulado. Amostras do filme (4 cm²) foram cortadas e mantidas em 20 mL de água destilada a 37°C até completa solubilização. Uma alíquota de 500 μL de cada amostra (gel e solução aquosa do filme solubilizado) foi adicionada em tubo de vidro e, em seguida, foram acrescentados 0,5 mL de solução de fenol 5% (m/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução resultante foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos e leitura da absorbância foi realizada utilizando um espectrofotômetro Genesys 10S em 490 nm.

4.4 Ensaio de esterilização dos filmes

Os filmes de alginato-babosa reticulados foram cortados em pedaços de 4 cm² e mantidos em uma capela de fluxo laminar com luz ultravioleta de 15 W (0, 30, 60 e 90 minutos) e, em seguida, transferidos para placas de petri com meio de cultura ágar sangue. Após incubação por 24 horas em estufa microbiológica a 35°C, observou-se a ocorrência de crescimento microbiano.

4.5 Ensaio de cicatrização

Os experimentos animais foram aprovados pela comissão de ética do uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (protocolo 7396/2015) e realizados no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, sob a supervisão do Prof. Dr. Leandro Lipinski.

Foram utilizados 60 ratos Wistar (machos) com peso entre 250 e 300 g. Os cálculos do n amostral foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder de teste em 80%, usando o programa GPower 3.1. Os animais foram distribuídos em 3 grupos (n=20): a) grupo controle (gaze estéril), b) grupo 1 (filme de alginato de sódio reticulado) e c) grupo 2 (filme de alginato-babosa reticulado).

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a jejum hídrico por 2 horas e alimentar de 4 horas. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40 mg/kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, foi produzida uma lesão (quadrada) cirúrgica com auxílio de bisturi na pele da região cervico-lombar atingindo a região dermo-epidérmica, medindo aproximadamente 4 cm², em cada animal.

As lesões foram recobertas com filmes de alginato reticulado e filmes alginato-babosa reticulado, imediatamente após a produção das lesões. Os animais do grupo controle receberam um curativo com gaze estéril. Em seguida, os curativos foram recobertos com bandagem e esparadrapo. Os animais não receberam nenhum outro tratamento com analgésico.

Após encerrada a anestesia, os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Todos permaneceram no biotério da Universidade Estadual de Ponta

Grossa em gaiolas individuais, com temperatura, luminosidade e umidade controlada. As bandagens foram retiradas 3 dias após a cirurgia. Enquanto a gaze dos animais do grupo controle saiu com a remoção das bandagens, os filmes de alginato e alginato-babosa permaneceram aderidos à lesão. Não foi feita nenhuma aproximação dos bordos da ferida e a cicatrização ocorreu por segunda intenção.

4.5.1 Avaliação da retração da lesão

A análise da retração da lesão foi realizada com os animais anestesiados com isoflurano administrado por via inalatória. A medida da área de cada ferida foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico (tempo 0) e nos dias 3, 7, 11, 14, 17 e 22 colocando-se um filme plástico transparente sobre a ferida e demarcando a respectiva área. As imagens demarcadas das feridas foram digitalizadas e as respectivas áreas determinadas utilizando o programa Image J.

4.6 Análise histológica

4.6.1 Coloração Hematoxilina Eosina

Nos dias 3, 7, 14 e 22, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados com uma super-dosagem de cloridrato de cetamina e xilazina. Dos locais das feridas, foram retirados fragmentos da borda direita das lesões com auxílio de um “*punch*” e fixados em formol 10% (v/v). Após a fixação, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, embebido e incluído em parafina, seccionado em micrótomo com espessura de 3 µm e corado com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação da resposta inflamatória quanto à celularidade e angiogênese, sob microscopia de luz. Após análise e seleção, as secções histológicas foram fotografadas com microscópio Olympus DP72 utilizando o programa CellSens Standard. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativa das amostras.

4.6.2. Picrosirius red

A análise histológica das fibras colágenas foi realizada com amostras das lesões dos animais dos grupos controle, alginato e alginato-babosa dos dias 14 e 22. Os tecidos das lesões foram desparafinizados, hidratados e corados utilizando picrosirius red em solução aquosa saturada de ácido pícrico. As imagens foram obtidas com microscópio de polarização Olympus LG-PS2 e para evitar variações

relacionadas ao processo de captura, as configurações da câmera e intensidade de luz foram idênticas para todas as amostras. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image J e os resultados expressos em pixels.

4.7 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada utilizando o programa IBM SPSS Statistics 2.0 pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguido do Teste de Tukey, com intervalo de confiança em 95% ($p \leq 0,05$).

5. Resultados e Discussão

5.1 Análises físico-químicas

5.1.1 Espectroscopia no infravermelho

As bandas no espectro de infravermelho (figura 8) do alginato de sódio (pó) utilizada na produção dos filmes são características do polímero. As bandas em 1620 e 1421 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo COO^- , respectivamente. O estiramento da ligação C-H ocorre em 2925 cm^{-1} e as bandas em 1051 cm^{-1} (ligação C-O-C) e 3388 cm^{-1} (grupo OH) também estão presentes (SARTORY; 1997, PEREIRA *et al.*, 2013).

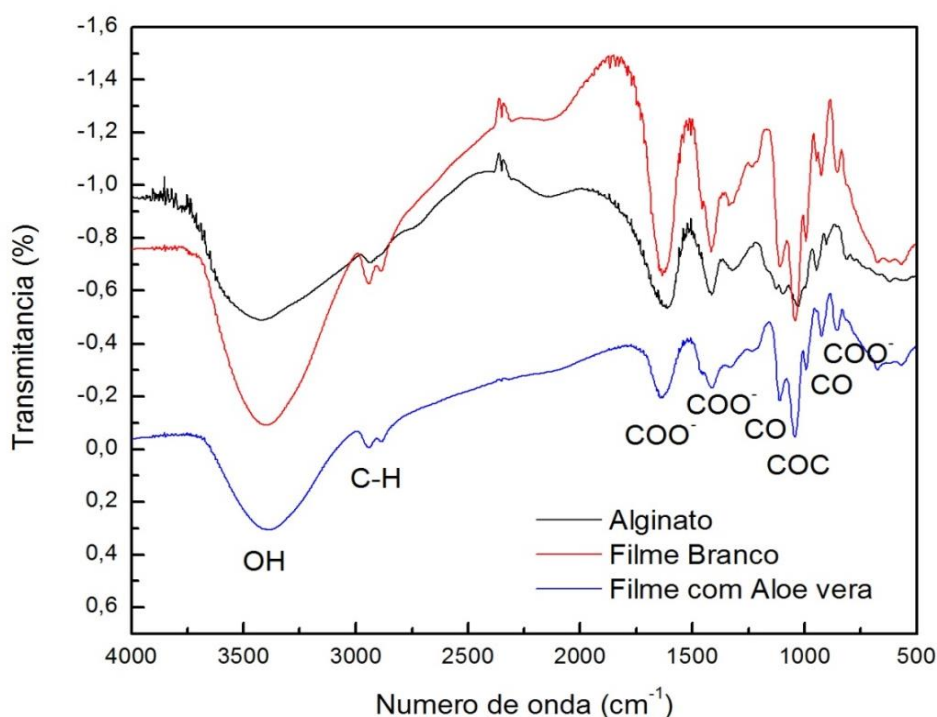


Figura 8. Espectro de infravermelho do alginato em pó, filme branco sem reticulação e filme alginato-babosa.

O espectro de infravermelho do filme reticulado contendo babosa é praticamente idêntico ao branco (alginato sem babosa e sem reticulação), uma vez que os grupamentos químicos dos principais componentes do gel são polissacarídeos. As bandas em 1736 cm^{-1} e 1248 cm^{-1} evidenciam a presença da carbonila e do estiramento (C-O) do éster O-acetil, respectivamente. Os grupos O-acetil são essenciais para a atividade biológica dos polissacarídeos mananas,

possivelmente por mascarar os grupamentos hidrofílicos e aumentar a permeabilidade celular (REYNOLDS; DWECK, 1999; CHANG; CHEN; FENG, 2011).

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram o aspecto rugoso no filme com gel de babosa não reticulado (figura 9-a), com alguns pontos brancos que podem ser devido ao cálcio ou outros íons presentes no próprio gel. A imagem do filme com gel de babosa reticulado com CaCl_2 (figura 9-b) mostra uma superfície mais homogênea, o que pode ser atribuído ao processo de reticulação em que cadeias de polissacarídeos são agregadas devido à formação de ligações com os íons Ca^{2+} , mudando a conformação estrutural do alginato (KHOTIMCHENKO *et al.*, 2001).

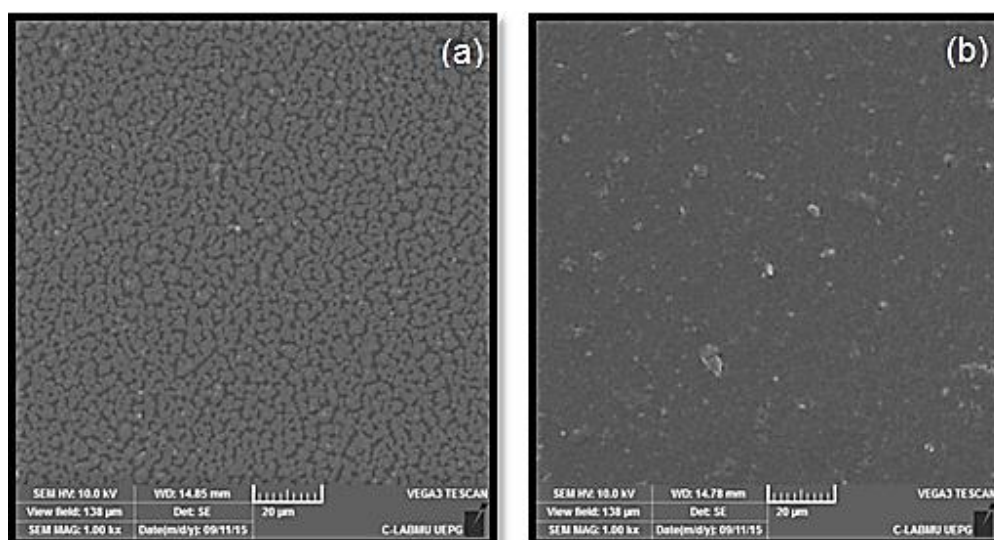


Figura 9. Microscopia eletrônica do filme alginato babosa não reticulado (a) e reticulado com CaCl_2 (b).

5.1.3 Ensaio de resistência mecânica à tração

A análise das propriedades mecânicas é importante para avaliar a elasticidade, plasticidade e resistência dos filmes. O filme alginato babosa reticulado com CaCl_2 apresentou maior força de tração necessária para ruptura e um menor deslocamento quando comparado com o filme sem reticulação (Figura 10). Essas propriedades são relevantes para aplicabilidade e manipulação dos curativos. Os filmes alginato-babosa sem reticulação são frágeis, solúveis e de difícil manuseio.

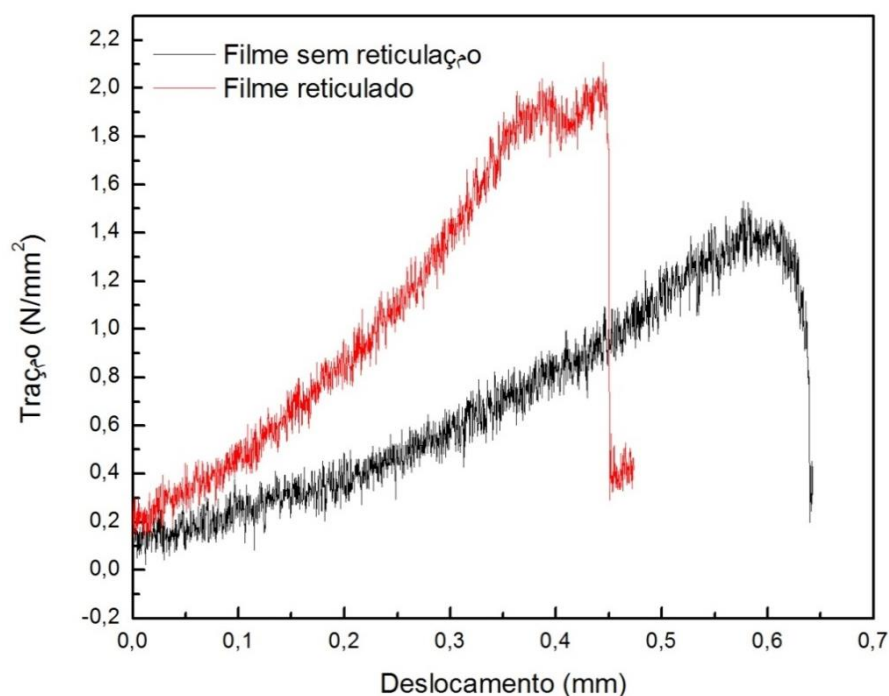


Figura 10. Ensaio de resistência mecânica à tração dos filmes alginato-babosa não reticulado e reticulado com CaCl_2 .

Os filmes reticulados com concentração adequada de Ca^{2+} são firmes, transparentes e favorecem a formação de gel quando em contato com exsudato. Quanto maior o grau de reticulação do filme, maior força necessária para ruptura, menor seu deslocamento e deformação devido a sua rigidez (LIMA; ANDREANI; SOLDI, 2007). Turbiani (2011) observou que o aumento na concentração de cálcio no processo de reticulação aumenta a tensão de ruptura do filme. Esse resultado pode ser explicado pela ligação formada entre os grupos carboxílicos presentes na molécula de alginato e os íons Ca^{2+} .

5.1.4 Ensaio de liberação de cálcio do filme alginato-babosa reticulado

O teste de liberação de cálcio foi realizado com o filme de alginato-babosa reticulado. O resultado mostrou um aumento da liberação em função do tempo até 60 minutos, permanecendo estável até o termino do ensaio, conforme o gráfico apresentado na Figura 11. O cálcio liberado é importante uma vez que quando o curativo entra em contato com a ferida ocorre uma troca dos íons Ca^{2+} com o Na^+ presente no exsudato. Essa troca iônica leva a formação de um gel na superfície da ferida, proporcionando um ambiente favorável à cicatrização. Além disso, o cálcio

mantém a hemostase e participa da cascata de coagulação (RATHINAMOORTHY; SASIKALA, 2011).

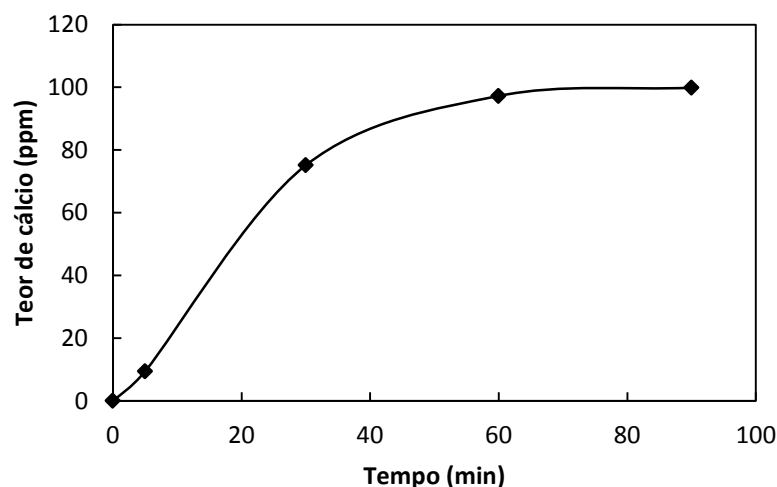


Figura 11. Liberação de cálcio do filme alginato-babosa reticulado com CaCl_2 .

5.1.5 Hidratação do filme alginato babosa reticulado

O teste de hidratação foi realizado com o filme alginato-babosa reticulado. Os filmes não reticulados dissolvem-se totalmente quando imersos em água. A amostra do filme reticulado foi pesada antes e após 10, 20, 30, 60 e 120 minutos de imersão em água a 37°C . O resultado mostra um aumento gradual na hidratação até 30 min, quando o filme atinge praticamente 15 vezes a sua massa inicial. Em seguida, a massa começa a diminuir lentamente, indicando ligeira solubilidade, provavelmente pela liberação de glicerina (Figura 12). A capacidade de hidratação do filme é relevante uma vez que a ferida, principalmente na fase inflamatória, libera exsudato. Além da absorção do exsudato, mantendo um ambiente úmido durante o processo de cicatrização, a hidratação pode contribuir para a liberação dos compostos ativos da babosa.

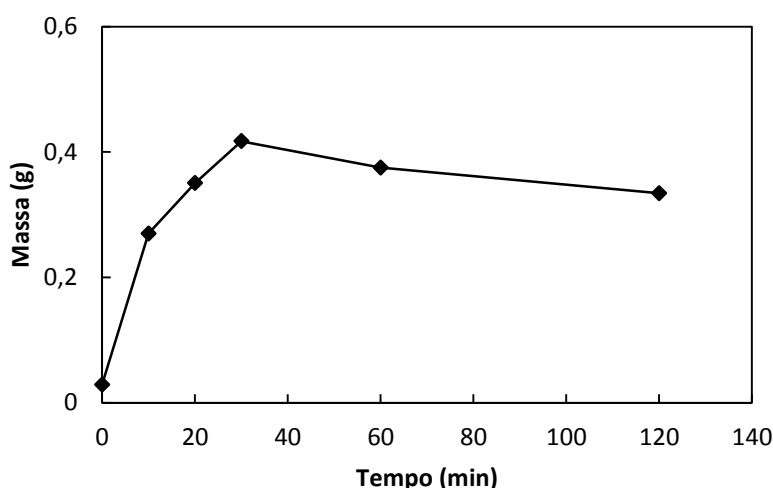


Figura 12. Hidratação do filme alginato-babosa reticulado.

O grau de hidratação de filmes de alginato e alginato-pectina foi estudado por Sriamornsak e Kennedy (2008). Os autores observaram que os filmes de alginato de cálcio atingiram elevado percentual de hidratação em 2 horas e que o tipo, a concentração do polissacarídeo e o grau de reticulação alteraram a extensão da absorção de água.

5.1.6 Ensaio de quantificação e liberação de polissacarídeos

Os polissacarídeos são os principais componentes ativos do gel de babosa. A liberação desses compostos no leito da ferida pode acelerar o processo de cicatrização (DAGNE, 2000). Os resultados obtidos na quantificação de polissacarídeos mostraram uma concentração maior no gel de babosa *“in natura”* (Figura 13). A diminuição da concentração de polissacarídeos no gel após o ciclo gelo-degelo pode estar relacionada à degradação desses compostos durante esse processo. O filme alginato-babosa apresentou quantidades menores de polissacarídeos quando comparado ao gel, o que pode ser devido à degradação durante o processamento e preparo do filme ou a incompleta solubilização no meio aquoso.

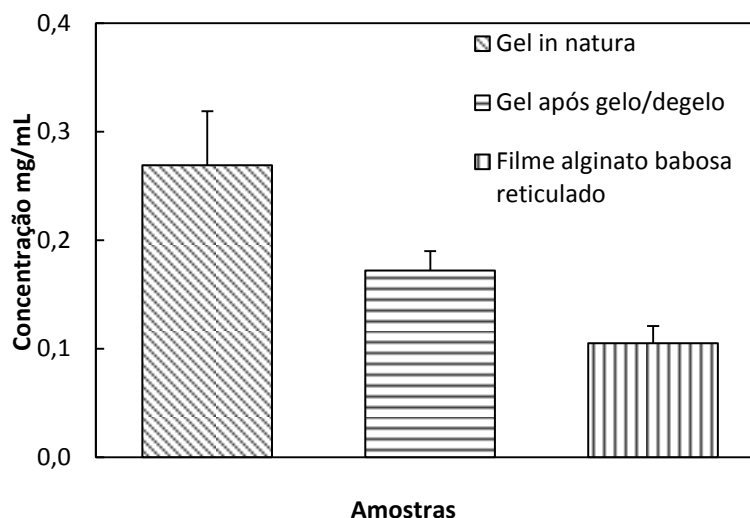


Figura 13. Teor de polissacarídeos no gel de babosa “*in natura*”, após gelo-degelo e no ensaio de liberação do filme alginato-babosa reticulado.

No entanto, a quantidade de polissacarídeos liberados do filme foi de 42 % em 15 minutos, indicando que a hidratação favorece a liberação dos compostos ativos e pode contribuir na cicatrização de feridas cutâneas.

O polissacarídeo acemanana é o principal composto ativo presente no gel da babosa (NI *et al.*, 2004; HAMMAN, 2008). Jettanacheawchankit *et al.* (2009) avaliaram os efeitos da acemanana em estudos *in vivo* e *in vitro*. No ensaio com fibroblastos gengivais humanos, foi observado um aumento na proliferação do fator de crescimento de queratinócito, fator de crescimento endotelial e a produção de colágeno tipo I. No ensaio com lesões na cavidade oral de ratos Sprague-Dawley com posterior tratamento tópico, observou-se que a acemanana acelerou o processo de cicatrização com maior regressão da lesão e epitelização quando comparada ao grupo controle.

5.2 Ensaio de esterilização dos filmes

Existem diferentes processos que podem ser utilizados na esterilização de filmes poliméricos, como o emprego de radiação gama, luz ultravioleta, óxido de etileno e calor (MARRECO *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi avaliada a esterilização por luz ultravioleta em capela de fluxo laminar. O filme alginato-babosa reticulado sem exposição à luz ultravioleta apresentou crescimento de micro-organismos. A partir de 30 minutos de exposição à luz UV, não foi observado qualquer crescimento

microbiano (Figura 14). A esterilização do filme é importante para evitar contaminações externas ao leito da ferida. Assim, todos os filmes utilizados no ensaio animal foram esterilizados pelo procedimento descrito.

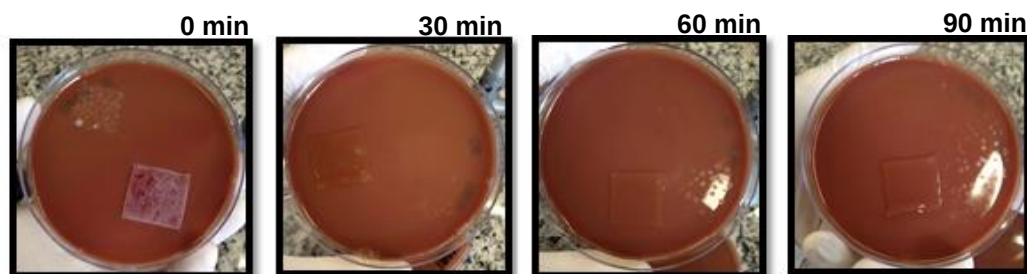


Figura 14. Crescimento microbiano no ensaio de esterilização de filmes alginato-babosa reticulado.

5.3 Ensaio de cicatrização

5.3.1 Análise da retração da lesão

O modelo experimental utilizado foi baseado em estudo realizado por Caetano *et al.* (2014) com lesão cirúrgica provocada no dorso de ratos Wistar, atingindo a região dermo-epidérmica.

A retração da lesão foi analisada medindo-se a área logo após o procedimento cirúrgico nos dias 0, 3, 7, 11, 14, 17 e 22. Não houve diferença significativa entre os grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle, conforme ilustrado na Figura 15.

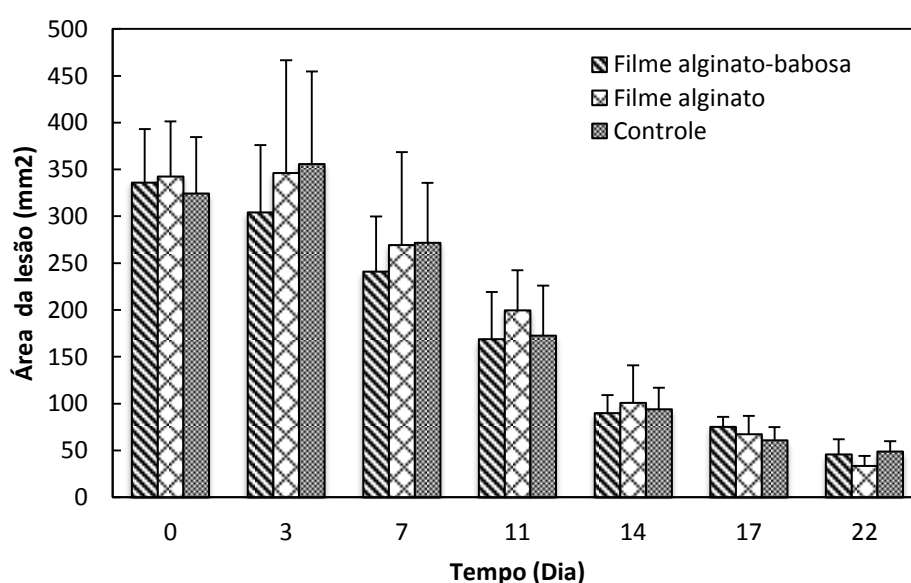


Figura 15. Retração da área da lesão dos animais nos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle.

A figura 16 apresenta as imagens das lesões de animais dos grupos tratados com filme alginato-babosa, filme alginato e controle onde é possível observar uma redução progressiva das áreas das lesões nos dias 3, 7, 14 e 22.

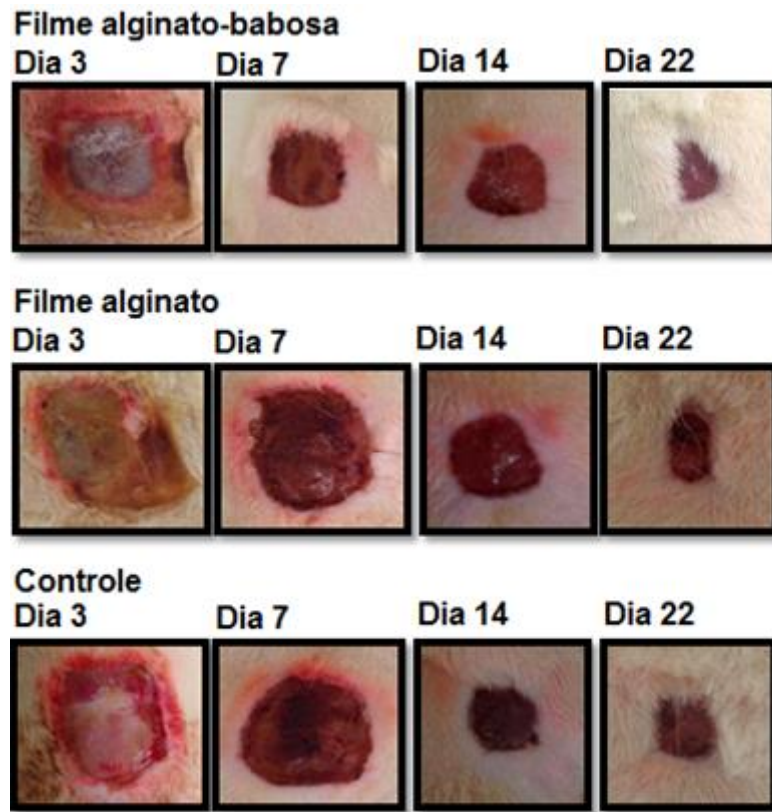


Figura 16. Imagem das lesões do ensaio de retração das feridas dos animais dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22.

A contração da ferida ocorre por meio de um movimento centrípeto de toda a espessura circundante da pele, reduzindo o tamanho da ferida (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

No tecido de granulação, os fibroblastos são ativados e tornam-se miofibroblastos. Fenotipicamente o miofibroblasto é um tipo de célula intermediária entre os fibroblastos e as células musculares lisas. Os miofibroblastos começam a aparecer no início da formação do tecido de granulação, tornam-se mais abundantes na fase de proliferação e desaparecem possivelmente por apoptose. Essas células sintetizam componentes da matriz extracelular que podem substituir a matriz provisória e possuem propriedades contráteis devido à expressão de α -actina do músculo liso que desempenham um papel importante na contração e maturação do tecido de granulação (LI; WANG, 2011; DARBY *et al.*, 2014).

A pesquisa realizada por Faleiro *et al.* (2009) avaliou o efeito do extrato glicólico de babosa na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos. Os resultados evidenciaram que ocorreu a re-epitelização e a re-estruturação satisfatórias da derme e uma evolução mais rápida da cicatrização nos ratos do grupo tratado com o extrato.

5.4 Análise histológica

5.4.1 Processo inflamatório

A análise qualitativa mostrou no dia 3 um denso infiltrado inflamatório em todos os grupos. No dia 7, observou-se uma diminuição do infiltrado nos grupos tratados com filmes alginato e alginato-babosa e um aumento no número de vasos sanguíneos no grupo controle. No dia 14, houve aumento da angiogênese nos grupos filme alginato e filme alginato-babosa e presença de infiltrado no grupo controle. Além disso, observou-se a ocorrência de macrófagos em todos os grupos no dia 22 (Figura 17).

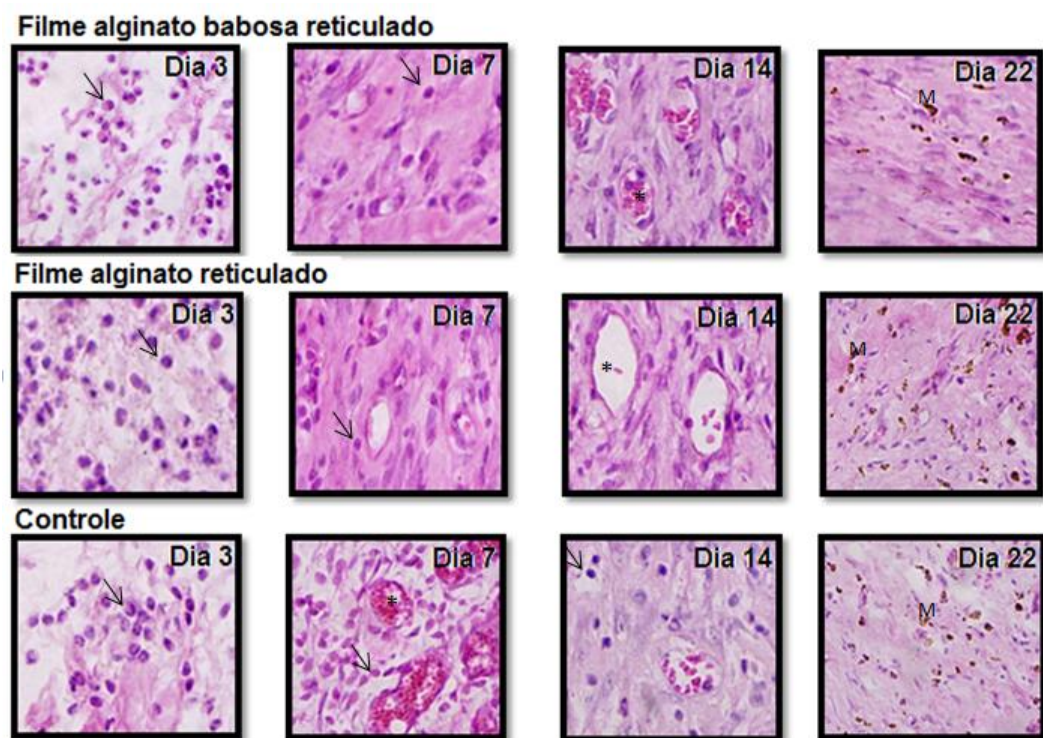


Figura 9. Fotomicrografia das feridas dos animais tratados com filme alginato babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22. Presença de infiltrado inflamatório (→), vasos sanguíneos (*) e macrófagos (M). Coloração HE, aumento 400x.

A avaliação quantitativa do processo inflamatório mostrou diferença significativa no 14^o dia com diminuição do infiltrado nos grupos filme alginato-babosa e filme alginato quando comparados com o grupo controle ($p=0,04$ e $p=0,05$, respectivamente). Esse resultado pode estar relacionado a um processo inflamatório exacerbado no grupo controle (Figura 18).

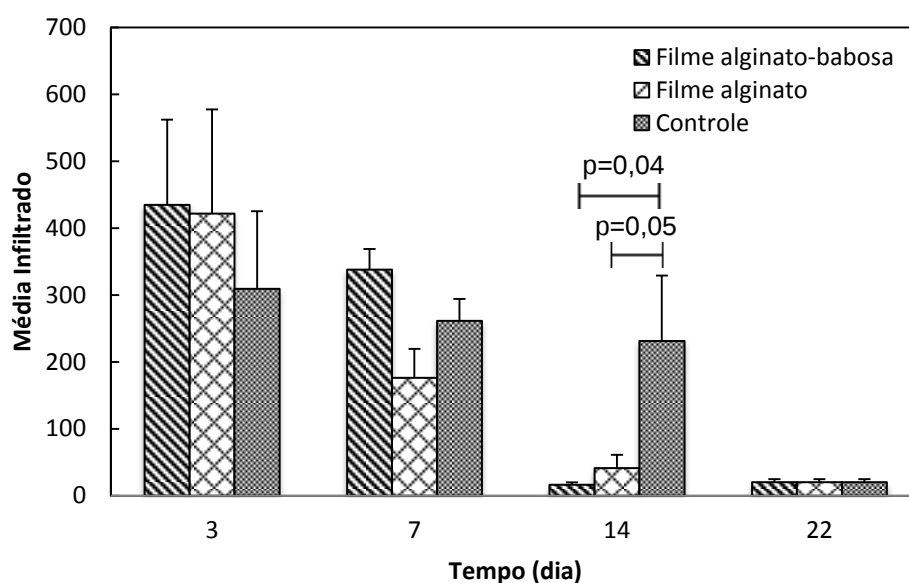


Figura 18. Infiltrado inflamatório dos grupos filme de alginato-babosa, filme de alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22.

Na fase inflamatória, ocorre a migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos ao local da lesão. No entanto, os neutrófilos chegam primeiro e em grande número devido a sua abundância na circulação sanguínea (CLARK, 2001). Existem três mecanismos utilizados pelos neutrófilos para a destruição de detritos e bactérias. O primeiro é a fagocitose, onde ocorre a ingestão e destruição das partículas estranhas. O segundo ocorre através da liberação de substâncias tóxicas (lactoferrina, proteases, elastase e catepsina). Estudos recentes mostraram ainda que os neutrófilos também são capazes de produzir cromatina e proteases que capturam e matam as bactérias no espaço extracelular (YOUNG; McNAUGHT, 2011).

A babosa possui atividade anti-inflamatória, entretanto não há estudos anteriores desse efeito utilizando-se filmes de alginato (DAS *et al.*, 2011). O estudo realizado por Devaraj e Karpagam (2011) avaliou o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso do gel de babosa por via oral em diferentes concentrações nos modelos de

edema de pata induzido por carragenina e formalina e teste de granuloma por bolas de algodão. Os resultados mostraram que todas as doses testadas (100, 200, 400 e 600 mg/kg) reduziram a inflamação aguda de maneira dose-dependente quando comparadas ao grupo controle tratado com indometacina. O tratamento por 7 dias reduziu o peso das bolas de algodão sugerindo uma diminuição do granuloma na inflamação crônica.

Os neutrófilos são importantes para que ocorra uma descontaminação efetiva da lesão. Espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso são produzidos para destruir micro-organismos patogênicos, no entanto, estas substâncias podem lesar o tecido normal (DOVI; HE; DiPIETRO, 2003; WILGUS *et al.*, 2003).

Os macrófagos desempenham um importante papel na cicatrização, pois assistem a resolução da inflamação, remoção de células apoptóticas e produção de citocinas que auxiliam na proliferação celular e restauração do tecido lesado (BARRIENTOS *et al.*, 2008; HENG, 2011). Essas células são multifuncionais e capazes de influenciar todas as fases de reparo, portanto, a modulação de suas funções é um importante alvo de estudo nos processos cicatriciais (KOH; DiPIETRO, 2011).

Existem duas classes de macrófagos: os classicamente ativados ou macrófagos tipo I que são pró-inflamatórios e macrófagos tipo II que são anti-inflamatórios. Em condições adequadas, células tipo I podem se transformar em tipo II. O ambiente e o momento em que as citocinas são produzidas é que estabelecem sua ação *in vivo* (DiPIETRO, 1995; KHANNA *et al.*, 2010).

A análise quantitativa dos macrófagos mostrou diferença significativa entre os grupos filme alginato-babosa e filme alginato ($p=0,0$) e filme alginato-babosa e controle ($p=0,007$). Os resultados mostraram um aumento dos macrófagos nos grupos filme alginato e controle, o que pode estar relacionado a uma resposta tardia do processo de cicatrização, quando comparado ao grupo tratado com o filme alginato-babosa que apresentou aumento no dia 14 e diminuição no dia 22, conforme mostrado na figura 19.

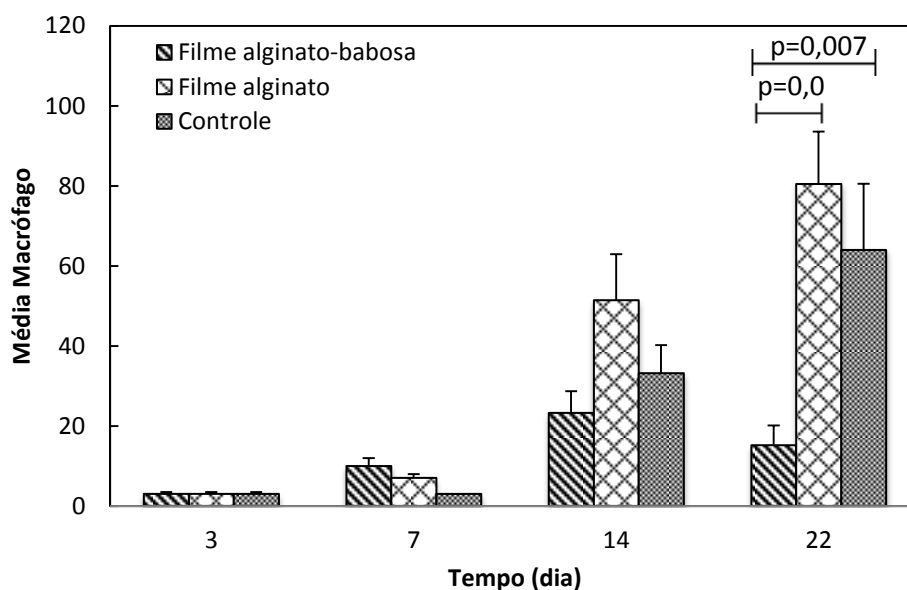


Figura 19. Macrófagos dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22.

A acemanana, principal polissacarídeo encontrado no gel da babosa foi capaz de estimular macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 a liberar citocinas como óxido nítrico e fator de necrose tumoral (ZHANG; TIZARD, 1996). Djeraba e Quere (2000) estudaram o efeito da acemanana em algumas doenças virais em aves. Os resultados mostraram que esse polissacarídeo é capaz de ativar macrófagos pela ligação aos receptores de manose, e ainda induzir a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de aves (HD11) viralmente transformados.

Em estudo realizado por Oryan *et al.* (2010), foi avaliado o efeito do extrato aquoso de babosa no tratamento de lesões cutâneas. As feridas foram realizadas cirurgicamente nos dorsos de ratos, divididos em dois grupos: sem tratamento e com tratamento tópico utilizando o extrato aquoso de babosa. Os animais foram sacrificados após 10 e 20 dias da lesão. Em seguida, foram feitas análises histopatológicas do tecido lesado. Nos animais do grupo tratado, após 10 dias, houve uma redução significativa da área lesionada, um aumento no número de vasos sanguíneos e as fibras de colágeno mostraram uma organização padrão. Após 20 dias, observou-se maior re-epitelização e uma diminuição do número de macrófagos e linfócitos.

5.4.2 Angiogênese

A formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes é uma etapa fundamental no processo de cicatrização. A angiogênese ocorre principalmente na matriz extracelular da ferida com a migração e estimulação das células endoteliais (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

A avaliação quantitativa da angiogênese mostrou diferenças significativas nos dias 7 e 14 entre os grupos filme alginato-babosa e controle ($p=0,004$ e $0,008$ respectivamente) e filme alginato e controle no dia 7 ($p=0,024$) como mostrado na figura 20. Os grupos filme alginato-babosa e filme alginato mostraram um aumento no número de vasos no dia 14, devido à formação do tecido de granulação e início da fase proliferativa. O grupo controle teve um aumento no número de vasos sanguíneos no dia 7, possivelmente em resposta a uma reação inflamatória exacerbada.

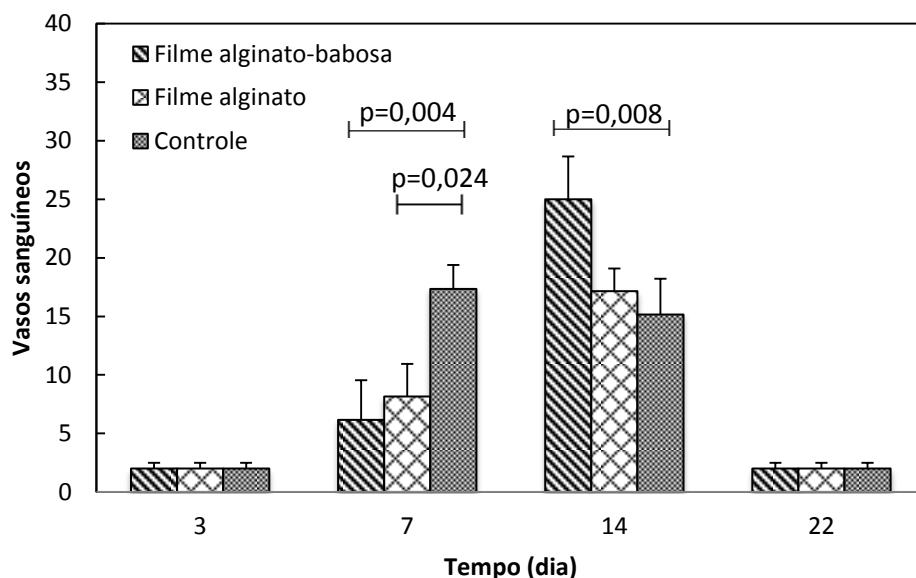


Figura 20. Vasos sanguíneos dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 3, 7, 14 e 22.

A angiogênese é um processo importante na cicatrização, pois participa da formação do tecido de granulação e fornece oxigênio e nutrientes para o tecido em crescimento. A migração das células endoteliais e o desenvolvimento dos capilares dependem das citocinas, fatores de crescimento e da organização dos componentes da matriz como a fibronectina e o colágeno (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003).

Após a lesão, as células endoteliais que revestem as paredes internas dos vasos sanguíneos são ativadas por hipóxia, fatores pró-angiogênicos como fator de crescimento endotelial, fator de crescimento de fibroblastos, angiotropina e angiogenina liberados por macrófagos e queratinócitos (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2012; GREAVES *et al.*, 2013). O início da regressão vascular está relacionado com a diminuição dos estímulos pró-angiogênicos e pode ser influenciada pelas mudanças na matriz extracelular que ocorrem durante a cura da ferida (DiPIETRO; 2013).

Atiba *et al.* (2011) estudaram o processo de cicatrização em animais que inicialmente sofreram radiação e após três dias uma lesão foi provocada na parte dorsal do centro do local irradiado. Os animais receberam tratamento via oral com pó de babosa comercial dissolvido em 1,5 mL de água nos dias 0, 3, 6, 9 e 12 após a lesão. Os animais do grupo tratado mostraram uma maior retração da lesão, aumento no número de vasos sanguíneos no sexto dia e um maior número de fibras colágeno.

5.4.3 Fibras colágeno

O colágeno tipo I constitui 90% do colágeno no organismo e sua principal função é proporcionar resistência à tensão, graças à espessura das fibras (MINAMOTO, 2007). O colágeno tipo III consiste em fibras mais finas, sendo considerado como uma matriz temporária durante a remodelação do tecido, ou seja, é o principal constituinte do tecido de granulação (DONAHUE; HIATT, BUSUTTIL, 2006; El SHERIF *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos na análise quantitativa das fibras colágeno mostraram diferença significativa nas fibras tipo I ($p=0,024$) e III ($p=0,05$) entre os grupos controle e tratados com o filme alginato-babosa.

Os gráficos das figuras 21 e 22 mostram uma diminuição das fibras tipo III e aumento das fibras colágeno tipo I no grupo tratado com filme alginato-babosa entre os dias 14 e 22. Este resultado evidencia a melhora na progressão do processo de cicatrização, uma vez que as fibras tipo III são imaturas e estão presentes no tecido de granulação. No decorrer do processo de cicatrização as fibras tipo III são substituídas por fibras tipo I, maduras e resistentes.

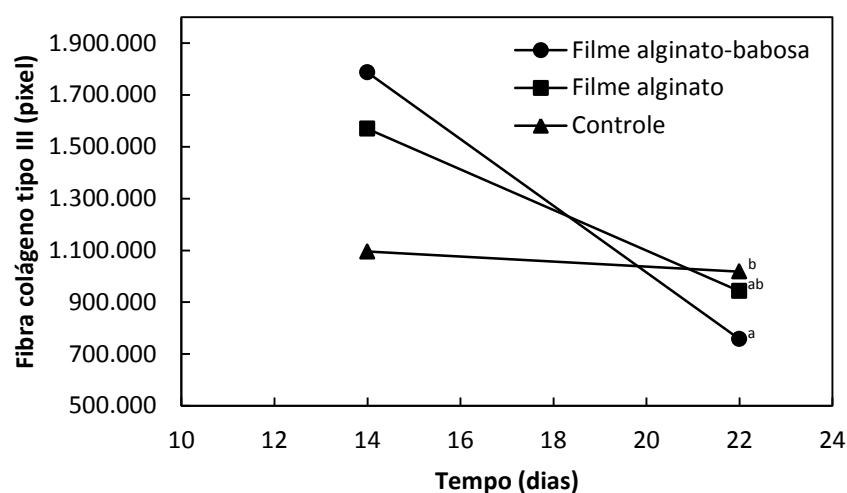


Figura 21. Fibras colágeno tipo III dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 14 e 22.

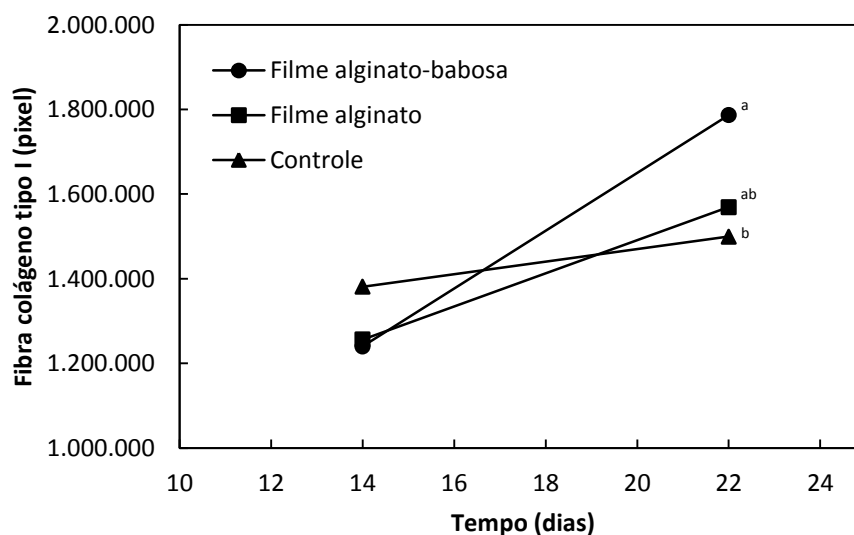


Figura 22. Fibras colágeno tipo I dos grupos filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 14 e 22.

O gel de babosa pode contribuir para a síntese de colágeno. Subramanian; Kumar e Arulselvan (2006) estudaram o potencial cicatrizante de babosa em lesões cutâneas de coelhos. A lesão recebeu tratamento tópico com gel de babosa duas vezes por dia, durante 14 dias. Os resultados mostraram um aumento nas fibras colágeno nos dias 7 e 14. O aumento na quantidade dessa proteína observada no tecido de granulação pode estar relacionado à maior ativação de fibroblastos. Foi possível observar ainda um aumento na proliferação celular e epitelização do tecido lesado.

Na coloração por picrosirius red, sob luz polarizada, as fibras tipo III (imaturas) apresentam coloração verde e as fibras tipo I (maduras) apresentam coloração vermelho-alaranjadas. No presente trabalho, foi possível observar fibras avermelhadas, finas e uniformes características do colágeno tipo I no dia 22 do grupo tratado com filme alginato-babosa, sugerindo uma melhor progressão da cicatrização. Nos grupos controle e tratado com filme de alginato, as fibras são grossas, verdes e desorganizadas, características de fibras tipo III (Figura 23).

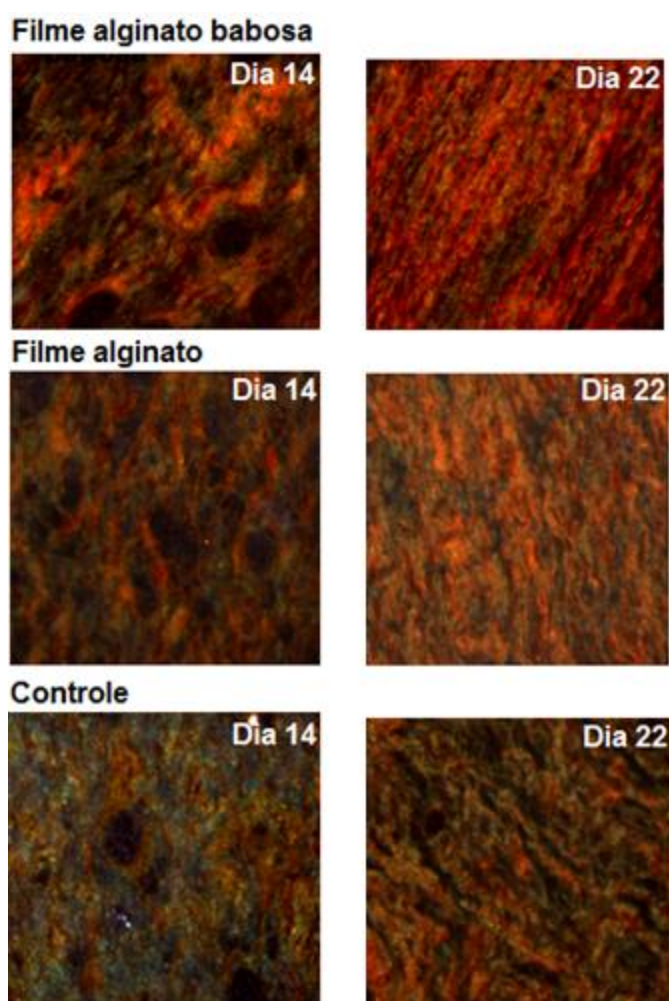


Figura 23. Aspecto das fibras colágenas I e III dos grupos tratados com filme alginato-babosa, filme alginato e controle nos dias 14 e 22. Coloração Picrosirius Red, aumento 200x.

O efeito cicatrizante do gel de babosa está, em parte, relacionado ao estímulo do crescimento e atividade dos fibroblastos. O aumento das proteínas no tecido de granulação pode ser devido a maior produção de pro-colágeno e mucopolissacarídeos por essas células (SUBRAMANIAN; KUMAR e ARULSELVAN, 2006). Chithra; Sajithlal e Chandrakasan (1998) estudaram os tipos e quantidade de

glicosaminoglicanos presentes no tecido de granulação de feridas de animais tratados oral e topicamente com gel de babosa. Os glicosaminoglicanos são os principais componentes sintetizados na matriz extracelular durante a cicatrização e formam uma estrutura para a deposição de colágeno e elastina. Os autores observaram diferenças qualitativas e quantitativas dos glicosaminoglicanos. O grupo tratado com babosa apresentou um aumento na síntese de glicosaminoglicanos e colágeno, favorecendo a cicatrização da ferida.

Inpanya *et al.* (2012) avaliaram o efeito do filme de fibroína com gel de babosa na cicatrização de feridas de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os resultados obtidos mostraram que os animais tratados com o filme contendo o gel preveniu a formação de crosta inflamada, acelerou o processo de epitelização e aumentou a produção de colágeno.

6. Conclusão

O processo de reticulação com solução iônica de cloreto de cálcio é essencial para que o filme alginato-babosa apresente maior resistência mecânica, menor solubilidade em meio aquoso e libere o íon cálcio no leito da ferida.

Os testes de caracterização físico-química comprovaram que o filme alginato-babosa reticulado possui as características adequadas em termos de transparência, uniformidade, resistência mecânica à tração e elevada capacidade de hidratação, compatível com o emprego como curativo de lesões cutâneas, além da liberação de polissacarídeos contidos no gel.

A avaliação *in vivo* da cicatrização de lesões cirúrgicas em ratos Wistar mostrou o efeito benéfico da adição do gel de babosa ao filme de alginato através das seguintes evidências: menor quantidade de infiltrado inflamatório, como neutrófilos e macrófagos, aumento da angiogênese durante a fase proliferativa e maior produção de fibras colágeno tipo I no dia 22. Esses efeitos podem ser atribuídos aos compostos ativos presentes no gel de babosa que possuem propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes.

7. Referências

- ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**. v. 29, n. 10, p. 491-495, 2011.
- AMSDEN, B.; TURNER, N. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 65, p. 605-610, 1999.
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 52, p. 407-422, 1991.
- ARWERT, E. N.; HOSTE, E.; WATT, F. M. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. **Nature Reviews**. v. 12, p. 170-180, 2012.
- ASHCROFT, G. S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. v.20, p. 38-49, 2011.
- ATIBA, A. *et al.* Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-and fibroblast growth factor production. **The American Journal of Surgery**. n. 201, n.6, p. 809-818, 2011.
- BACH, D. B.; LOPES, M. A. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*Aloe vera* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. v. 31, n. 4, p. 1-9, 2007.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BARNETT, S. E.; VARLEY, S.J. The effects of calcium alginate on wound healing. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**. v.69, p.153-155, 1987.
- BARONI, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**. v. 30, p. 257-262, 2012.
- BARRIENTOS, S.; *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. v. 16, p. 585-601, 2008.
- BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with Cellular and Molecular Events. **American Society for Dermatologic Surgery**. v. 31, p. 674-686, 2005.
- BEANES, S.R. *et al.* Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 5, p. 1-11, 2003.
- BERGO, P. V. A. *et al.* Physical properties of edible films based on cassava starch as affected by the Plasticizer Concentration. **Packaging Technology and Science**. v. 21, p. 85-89, 2008.
- BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 70, p. 2059-2081, 2013.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 104, p. 3653-3680, 2015.

BOZZI, A. *et al.* Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. **Food Chemistry**. v. 103, p. 22-30, 2007.

BRACCINI, I.; PEREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**. v. 2, p. 1089-1096, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 117, n. 7, p. 1-32, 2006.

CAETANO, G. F. *et al.* Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Society for Biomaterials**. v. 00B, p. 1-10, 2014.

CAMPOS, A. C. L.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Pharmaceutical Issues and Technical Problems**. v. 11, p. 281-288, 2008.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**. v. 23, p. 729-735, 2009.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 242, p. 259-262, 2002.

CHANG, X. L.; CHEN, B. Y.; FENG, Y. M. Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of *Aloe vera* Miller. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 42, p. 197-203, 2011.

CLARK, R. A. F. Fibrin and wound healing. **Annals New York Academy of Sciences**. p. 355-367, 2001.

CLARK, R. A. F. *et al.* Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from $\alpha\text{v}/\beta 5$ to $\alpha\text{v}/\beta 6$ integrins. **British Journal of Dermatology**. v. 135, p. 46-51, 1996.

CHENG, L. H.; KARIM, A. A.; SEOW, C. C. Effects of water-glycerol and water-sorbitol interactions on the physical properties of konjac glucomannan films. **Journal of Food Science**. v. 71, n. 2, p. 62-67, 2006.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 59, p. 179-186, 1998.

CHOI, J. S.; PARK, W. H. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Testing**. v. 23, p. 455-460, 2004.

CHOI, S.; CHUNG, M. Relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**. v. 1, n. 1, p. 53-62, 2003.

CORSETTI, G. *et al.* Topical application of dressing with amino acids improves cutaneous wound healing in aged rats. **Acta Histochemica**. v. 112, p. 497-507, 2010.

CUTTING, K. F. Wound exsudate: composition and functions. **Clinical Review**. p. 4-9, 2004.

DAGNE, E. *et al.* Chemistry of *Aloe* species. **Current Organic Chemistry**. v. 4, p. 1055-1078, 2000.

DARBY, I. A. *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**. v. 4, n. 7, p. 301-311. 2014.

DARLENSKI, R. KAZANDJIEVA, J. TSANKOV, N.; Skin barrier function: morphological basis and regulatory mechanisms. **Journal of Clinical Medicine**. v. 4, n. 1, p. 36-45, 2011.

DAS, S. *et al.* Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 48, p. 38-43, 2011.

DAT, A. D. *et al.* *Aloe vera* for treating acute and chronic wounds. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. p. 1-11, 2012.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; DURHAM, J. T.; HERMAN, I. M. Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing. **Wound Healing Society**. p. 17-22, 2012.

DETMAR, M. *et al.* Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 108, n. 3, p. 263-268, 1997.

DiPIETRO, L. A. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. **Medical Physiology and Rheumatic Diseases**. v. 25, n.1, p. 87-91, 2013.

DiPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shoke**. v. 4, n. 4, p. 233-240, 1995.

DJERABA, A. QUERE, P. *In vivo* macrophage activation in chickens with acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. **International Journal of Immunopharmacology**. v. 22, p. 365-372, 2000.

DOVI, J. V.; HE, L.; DiPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 73, n. 4, p. 448-455, 2003.

DRAGET, K. I.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate from *Algae*. polysaccharides and polyamides in the food industry. **Biopolymers Online**. v. 6, p. 1-30, 2005.

DEVARAJ, A.; KARPAGAM, T. Evaluation of anti-inflammatory activity and analgesic effect of *Aloe vera* leaf extract in rats. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 2, n. 3, p. 103-110, 2011.

DONAHUE, T. R.; HIATT, J. R.; BUSUTTIL, R. W. Collagenase and surgical disease. **Hernia**. v. 10, p.478-485, 2006.

EHRENREICH, M. RUSZCZAK. Z.; Update on tissue-engineered biological dressings. **Tissue Engineering**. v. 12, n. 9, p. 2407-2424, 2006.

ELIAS, P. M. CHOI. E. H.; Interactions among stratum corneum defensive functions. **Experimental Dermatology**. v. 14, p. 719-726, 2005.

El SHERIF, A. *et al.* Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect? **Hernia**. v. 10, n. 6, p. 511-520, 2006.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery**. v. 26, n.2, p. 31-37, 2007.

FALEIRO, C. C. *et al.* O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza On Line**. v. 7, n. 2, p. 56-60, 2009.

FEMENIA, A. *et al.* Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**. v. 39, p. 109-117, 1999.

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

FREITAS, 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.

GABBIANI, G.; CHAPONNIER, C.; HUTTNER, I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. **The Journal of Cell Biology**. v. 76, p. 561-568, 1978.

GALDEANO, M. C. *et al.* Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering**. v. 29, p. 532-538, 2009.

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.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and wound healing. **World Journal of Surgery**. v. 28, p. 321-326, 2004. **Surgery**. v. 26, n.2, p. 31-37, 2007.

GREAVES, N. S. *et al.* Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**. v. 72, p. 206-217, 2013.

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 16, p. 117-151, 1986.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**. v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Development and Therapeutics**. v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**. v. 453, p. 314-321, 2008.

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

HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**. v. 17, p. 6-15, 2004.

HART, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. **Journal of Wound Care**. v. 11, n. 6, p. 205- 209, 2002.

HAUG, Q.; SMIDSRØD, O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 24, p. 843-854, 1970.

HENG, M. C. Y. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. **International Journal of Dermatology**. v. 50, p. 1058-1066, 2011.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 36, p. 667-685, 2006.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**. v. 69, p. 11-25, 1992.

INPANYA, P. *et al.* Effects of the blended fibroin/aloe gel film on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedical Materials**. v. 7, p. 1-14, 2012.

JANIS, J. E., HARRISON, B. Wound healing: Part I. basic science. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 133, n. 2, p. 199-207, 2014.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 322-337, 2011.

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, p. 525-531, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 12th. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2013.

KHANNA, S. *et al.* Macrophage Dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. **Plos One**. v. 5, n. 3, p. 1-12, 2010.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**. v. 24, p. 2339-2349, 2003.

KHOTIMCHENKO, Y. S. *et al.* Physical–chemical properties, physiological activity, and usage of alginates, the polysaccharides of brown algae. **Russian Journal of Marine Biology**. v. 27, n. 1, p. 53-64, 2001.

KNILL, C. J. *et al.* Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**. v. 55, p. 65-76, 2004.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 13, p. 1-12, 2011.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. **Food Hydrocolloids**. v. 20, p. 1057-1071, 2006.

KUO, C. K.; MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**. v. 22, p. 511-521, 2001.

LANSDOWN, A. B. G. Mechanical and barrier properties of sodium alginate films obtained using calcium benzoate and/or calcium chloride as the crosslinking agent. **Wound Repair and Regeneration**. v. 10, n. 5, p. 271-285, 2002.

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

LEONARD, M. *et al.* Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. **Journal of Controlled Release**. v. 98, p. 395-405, 2004.

LI, B.; WANG, J. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**. v. 20, p. 108-120, 2011.

LI, J.; ZHANG, Y.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic Growth Factors and the Extracellular Matrix. **Microscopy Research and Technique**. v. 60, p. 107-114, 2003.

LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**. v.30, n.4, p. 832-837, 2007.

MARRECO, P. R. *et al.* Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v. 71, n.2, p. 268-277, 2004.

MAURSTAD, G. *et al.* 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.

MAYET, N. *et al.* A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 103, p. 2211-2230, 2014.

McHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. **Fisheries Technical Paper**. n. 441, 105p, 2003.

MENAKER, G. M. Wound dressings at the turn of the millennium. **Current Problems in Dermatology**. p. 86-89, 2001.

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

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO, J. Cicatrização de feridas crônicas-algumas opções terapêuticas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**. v. 70, n. 4, p. 423-433, 2012.

MINAMOTO, V. B. Efeitos da desnervação no músculo esquelético: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**. v. 20, n. 3, p. 63-69, 2007.

MOGHADDASI, S.; VERMA, S. K. *Aloe vera* their chemicals composition and applications: A review. **International Journal of Biological & Medical Research**. v. 2, n. 1, p. 466-471, 2011.

MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing an overview. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 30, p. 1-12, 2003.

MOORE, K. *et al.* Prediction and monitoring the therapeutic response of chronic dermal wounds. **International Wound Journal**. v. 3, p. 89-96, 2006.

MORCH, Y. A. *et al.* Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**. v. 7, p. 1471-1480, 2006.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature**. v. 8, p. 958-969, 2008.

NI, Y. *et al.* Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**. v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NUNAMAKER, E. A.; PURCELL, E. K.; KIPKE, D. R. *In vivo* stability and biocompatibility of implanted calcium alginate disks. **Journal of Biomedical Materials Research**. p. 1128-1137, 2007.

ODA, R. M. Manual de normas, rotinas e técnicas de curativos. Ed. 1, p. 1-34, Bauru, 2004.

ORYAN, A. *et al.* Effect of aqueous extract of *Aloe vera* on experimental cutaneous wound healing in rat. **Veterinary Archives**. v. 80, n. 4, p. 509-522, 2010.

PALADINI, R. D. *et al.* Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. **The Journal of Cell Biology**. v. 132, n. 3, p. 381-397, 1996.

PARENTE, L. M. L. *et al.* *Aloe vera*: botanical, phytochemical and therapeutic characteristics. **Arte Médica Ampliada**. v. 33, n. 4, p. 160-164, 2013.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**. v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

- PAVLATH, A. E. *et al.* Ionomeric films of alginic acid. **Journal of Food Science**. v. 64, n. 1, p. 61-53, 1999.
- PERCIVAL, N. J. Classification of wounds and their management. **The Medicine Publishing Company**. p. 114-117, 2002.
- PEREIRA, R.; MENDES, A.; BARTOLO, P. Alginate/*Aloe vera* hydrogel films for biomedical applications. **Procedia CIRP**. p. 210-215, 2013.
- PEREIRA, R. *et al.* Development of novel alginate based hydrogel film for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 52, p. 221-230, 2013.
- PILCHER, B. K. *et al.* The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. **The Journal of Cell Biology**. v. 137, n. 6, p. 1445-1457, 1997.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**. v. 17, p. 1063-1072, 2008.
- RAHMAN, S.; CARTER, P.; BHATTARAI, N. *Aloe vera* for tissue engineering applications. **Journal of Functional Biomaterials**. v. 8, n. 6, p. 1-17, 2017.
- RAMACHANDRA, C. T.; RAO, P. S. Processing of *Aloe Vera* leaf gel: a review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**. v. 3, n. 2, p. 502-510, 2008.
- RAMASASTRY, S. S. Acute wounds. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 32, p. 195-208, 2005.
- RAMOS, A. P.; PIMENTEL, L. C. Ação da babosa no reparo tecidual e cicatrização. **Brazilian Journal of Health**. v. 2, n. 1, p. 40-48, 2011.
- RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; BURLANDO, B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: An in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 134, p. 443-449, 2011.
- RATHINAMOORTHY, R.; SASIKALA, L. Polysaccharide fibers in wound management. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 3, p. 38-44, 2011.
- REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 3, p. 3-37, 1999.
- RHIM, J. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. v. 37, p. 323-330, 2004.
- RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**. v. 386, p. 671-674, 1997.
- ROBBINS & COTRAN. Patologia: Bases patológicas das doenças. 9th. Rio de Janeiro. Elsevier, 2016.
- ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems in Surgery**. v. 38, n. 2, p. 72-140, 2001.

ROTTA, J. *et al.* Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering**. v. 29, p. 619-623, 2009.

SACCU, D.; BOGONI, P.; PROCIDA, G. *Aloe* exudate: characterization by reversed phase HPLC and headspace GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 10, p. 4526-4530, 2001.

SARTORI, C. The characterisation of alginate systems for biomedical applications. 1997.223f. Dissertação (Doutorado em Filosofia) - Department of Materials Engineering, Brunel University. 1997.

SATHYAPRABHA, G. *et al.* A comparative study on antioxidant, proximate analysis, antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Aloe vera* and *cissus quadrangularis* by GC-MS. **Journal of Pharmacy Research**. v. 3, n. 12, p. 2970-2973, 2010.

SCHMIDT, C. *et al.* Biological studies on brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, p. 523-532, 2009.

SMANIOTTO, P. H. S. *et al.* Tratamento clínico das feridas – curativos. **Revista Médica**. v. 89, p. 137-141, 2010.

SOOD, A.; GRANICK, M. S.; TOMASELLI, N. L. Wound dressings and comparative effectiveness data. **Advanced in Wound Care**. v. 3, n. 8, p. 511-529, 2014.

SUBRAMANIAN, S.; KUMAR, D. S.; ARULSELVAN, P. Wound healing potential of *Aloe vera* leaf gel studied in experimental rabbits. **Asian Journal f Biochemistry**. v. 1, n. 2, p. 178-185, 2006.

SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 358, p. 205-213, 2008.

STOJADINOVIC, A. *et al.* Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**. v. 111, p. 70-80, 2008.

STRODTBECK, F. Physiology of wound healing. **Newborn and Infant Nursing Reviews**. v. 1, n. 1, p. 43-52, 2001.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**. v. 6, p. 1285-1309, 2013.

SYED, T. A. *et al.* Management of psoriasis with *Aloe Vera* extract in a hydrophilic cream: a placebo-controlled, double-blind study. **Tropical Medicine and International Health**. v. 1, n. 4, p. 505-509, 1996.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina Ribeirão Preto**. v. 41, n.3, p. 259-264, 2008.

THARANATHAN, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**. v. 14, p. 71-78, 2003.

THEORET, C. Tissue engineering in wound repair: the three “R”s—repair, replace, regenerate. **Veterinary Surgery**. v. 38, p. 905-913, 2009.

TURBIANI, F. R. B. Mechanical and barrier properties of sodium alginate films obtained using calcium benzoate and/or calcium chloride as the crosslinking agent. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 14, n. 2, p. 82-90, 2011.

VEIGA-SANTOS, P. *et al.* Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch–gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. **Food Chemistry**. v. 103, p. 255-262, 2007.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**. v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.

VIEIRA, M. G. A. *et al.* Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. **European Polymer Journal**. v. 47, p. 254-263, 2011.

VEGA, A. G. *et al.* *Aloe vera* (*Aloe barbadensis miller*) component of functional foods. **Revista Chilena de Nutricion**. v. 32, n.3, p. 1-8, 2005.

WATT, F. M.; FUJIWARA, H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 3, p. 1-14, 2011.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**. v. 34, n. 10, p. 98-110, 2006.

WILGUS, T. A. *et al.* Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. **Wound Repair and Regeneration**. v. 11, n. 1, p. 25-34, 2003.

YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**. v. 29, n. 10, p. 475-479, 2011.

YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I. V. Drug synthesis methods and manufacturing technology. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 40, n. 2, p. 85-92, 2006.

ZHANG, Y.; HAN, J. H. Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols. **Institute of Food Technologists**. v. 71, n. 2, p. 109-118, 2006.

ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**. v. 35, n. 2, p. 119-128, 1996.

ZHAO, X. *et al.* Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as selfhealing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. **Biomaterials**. v. 122, p. 34-47, 2017.