

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

SOLANGE CHOPEK

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
CICATRIZANTE DE UM HIDROGEL DE ALGINATO CONTENDO EXTRATO DE
Calendula officinalis L.**

PONTA GROSSA

2021

SOLANGE CHOPEK

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
CICATRIZANTE DE UM HIDROGEL DE ALGINATO CONTENDO EXTRATO DE
Calendula officinalis L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas como requisito para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira.

**PONTA GROSSA
2021**

C549

Chopek, Solange

Obtenção, caracterização físico-química e avaliação do efeito cicatrizante de um hidrogel de alginato contendo extrato de *Calendula officinalis* L./ Solange Chopek. Ponta Grossa, 2021.
74 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas – Área de concentração – Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ailton Vicente Pereira

1. Feridas. 2 Curativo. 3. Hidrogel. 4. Fitoterapia. 5. *Calendula officinalis* L. I. Pereira, Ailton Vicente (Orient.). II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD : 574.192

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986

ATA DA DEFESA



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 04/2021, DA MESTRANDA SOLANGE CHOPEK REALIZADO NO DIA 25 DE JUNHO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e cinco dias de Junho de dois mil e vinte e um, às 9h00min, em conformidade com o Art.2º da portaria CAPES n. 36 de 19 de março de 2020, através do sistema de webconferência do NUTEAD da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em seção pública, sob a presidência do Prof. Dr. Airton Vicente Pereira reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Solange Chopek** na linha de pesquisa: Pesquisa de compostos com atividade biológica, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Profa Dra Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR) e Profa Dra Thaís Andrade Costa Casagrande (Universidade Positivo/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **"OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DE UM HIDROGEL DE ALGINATO CONTENDO EXTRATO DE *Calendula officinalis* L"**. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado da avaliação da dissertação como **APROVADA**. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, a aluna terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: sim

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

Profa Dra Michele Dietrich Moura Costa (DEBIOGEM - UEPG) – Titular

Profa Dra Thaís Andrade Costa Casagrande (UP/PR) – Titular

Ponta Grossa, 25 de Junho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de mestrado, de muito estudo, esforço e dedicação, gostaria de agradecer algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais este sonho. Por isso, expresso aqui, através de palavras a minha sincera gratidão.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Geraldo e Luciane pela compreensão e pelo apoio. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e chegar aqui e, principalmente, pelo amor imenso que vocês têm por mim. A vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou.

Minha gratidão especial ao Prof. Dr. Ailton Vicente Pereira, meu orientador, obrigada pela sua paciência, seus ensinamentos e sua dedicação, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. E, principalmente, obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim. Sem sua orientação, em todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

Um obrigado especial ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim.

Quero também agradecer as colegas Dani, Rayza e Yasmin por todo companheirismo e amizade.

A Prof. Dr. Marcia, Prof. Dr. Leandro e Prof. Dr. Adriana por toda ajuda.

Aos membros da banca de Qualificação e Defesa do Mestrado, pelos conselhos e sugestões.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas.

Por fim, o agradecimento mais importante: agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, me guiando, iluminando cada passo meu e me abençoando. Obrigada por me darem a fé e a força necessária para lutar e enfrentar todos os obstáculos, sem nunca desistir.

RESUMO

Feridas crônicas como úlceras diabéticas, vasculares e por pressão exigem cuidados de enfermagem, trocas frequentes de curativos e tratamento prolongado. Apesar da diversidade de curativos comerciais, é necessária a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos cicatrizantes eficazes e de baixo custo. O alginato é um polímero natural extraído das algas marinhas e muito utilizado na fabricação de curativos. Hidrogéis de alginato são utilizados no desbridamento autolítico e no tratamento de feridas secas ou com moderada produção de exsudato. A incorporação de compostos ativos em hidrogéis de alginato pode potencializar o efeito cicatrizante. *Calendula officinalis* L, conhecida popularmente como calêndula, é uma planta medicinal com propriedades antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e antisséptica. Este trabalho apresenta o desenvolvimento, a caracterização físico-química e a avaliação do efeito cicatrizante de um hidrogel de alginato contendo extrato de calêndula. O efeito cicatrizante foi avaliado utilizando o modelo de lesões induzidas cirurgicamente na pele da região dorsal de ratas Wistar. Foram utilizadas 50 ratas ooforectomizadas, divididas em dois grupos (n = 25). As lesões foram tratadas com hidrogel de alginato (grupo 1, controle) e com o hidrogel de alginato-calêndula (grupo 2). As áreas das lesões foram medidas periodicamente no transcorrer do tratamento por 28 dias. Nos dias 2, 7, 14, 21 e 28 da lesão, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados e fragmentos de pele do local da lesão foram retirados para análise histológica. A coloração com hematoxilina-eosina foi utilizada para a quantificação de infiltrado inflamatório, avaliação da angiogênese e contagem de macrófagos. As fibras colágenas foram avaliadas utilizando a coloração com picosirius red com a mensuração da abundância relativa das fibras tipos I e III. O hidrogel de alginato-calêndula demonstrou características físico-químicas e de estabilidade adequadas para a aplicação em feridas cutâneas. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos na retração das lesões nos dias 14 e 21. A análise histológica mostrou que o hidrogel de alginato-calêndula modulou a fase inflamatória com diminuição do infiltrado inflamatório nos dias 14 e 21 e do número de macrófagos no 21º dia. A análise das fibras colágenas evidenciou a diminuição de fibras tipo III e aumento das fibras tipo I no 14º dia nas lesões tratadas com o hidrogel alginato-calêndula, sugerindo uma melhora na progressão da cicatrização.

Palavras-chave: Feridas. Curativo. Hidrogel. Fitoterapia. *Calendula officinalis* L.

ABSTRACT

Chronic wounds such as diabetic, vascular and pressure ulcers require nursing care, frequent change of wound dressings and prolonged treatment. Despite the variety of products available on the market there is a need for the development of new, effective and low-cost wound dressings. Alginate is a natural polymer extracted from seaweed and widely used in the manufacture of wound dressings. Alginate hydrogels are used in autolytic debridement and for the treatment of dry and low to moderately exuding wounds. The incorporation of active compounds in alginate hydrogels can enhance the healing effect. *Calendula officinalis* L., popularly known as marigold, is a medicinal plant with antimicrobial, anti-inflammatory, healing and antiseptic properties. This work presents the development and evaluation of the healing effect of an alginate hydrogel containing marigold extract. The healing effect was evaluated on excisional wounds created on the back of female Wistar rats. Fifty ovariectomized rats were divided into two groups (n = 25) and lesions were treated with alginate hydrogel (group 1, control) or alginate-marigold hydrogel (group 2). The areas of the lesions were measured during 28 days. On days 2, 7, 14, 21 and 28 of the lesion, five animals from each group were euthanized and fragments of skin from the lesion site were removed for histological analysis. Hematoxylin and eosin stains were performed to quantify inflammatory infiltrate, assess angiogenesis and macrophage count. Picrosirius red analysis was used to compare the relative abundance of collagen types I and III fibers. The alginate-marigold hydrogel presented physicochemical and stability properties suitable for application in the treatment of wounds. Significant differences were observed on the 14th and 21st days between the groups in the wound retraction rates. Histological analysis showed that the alginate-marigold hydrogel modulated the inflammatory phase with a decrease in inflammatory infiltrate on days 14 and 21 and macrophages on the 21st day when compared to the control group. The analysis of collagen fibers showed that there was a decrease in type III fibers and an increase in type I fibers on the 14th day in lesions treated with alginate-marigold hydrogel, suggesting an improvement in the healing progression.

Keywords: Wound dressing. Hydrogel. Alginate. Phytotherapy. *Calendula officinalis* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das camadas da pele	12
Figura 2 - Etapas do processo de cicatrização.....	15
Figura 3 - Estruturas moleculares de sequências de subunidades de ácido gulurônico e ácido manurônico presentes no alginato	22
Figura 4 - Flor da espécie <i>Calendula officinalis</i> L.....	25
Figura 5 - Estrutura molecular dos flavonoides quercetina e rutina.....	26
Figura 6 - Etapas da pesquisa.....	28
Figura 7 - Flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	29
Figura 8 - Teste de espalhabilidade	33
Figura 9 - Células da face adaxial da corola de <i>Calendula officinalis</i> L (fucsina; aumento 40x)	37
Figura 10 - Estômatos encontrados na face abaxial da corola de <i>Calendula officinalis</i> L (fucsina; 40x)	38
Figura 11 - Tricomas na face abaxial da corola de <i>Calendula officinalis</i> L. (fucsina; 40X).....	38
Figura 12 - Curva de calibração de quercetina.....	40
Figura 13 - Hidrogéis de alginato	42
Figura 14 - Espalhabilidade das formulações em relação ao peso adicionado	46
Figura 15 - Valores de pH das formulações armazenadas a 5 °C por 15 dias.	50
Figura 16 - Valores de pH das formulações armazenadas a 25 °C por 15 dias.	50
Figura 17 - Valores de pH das formulações armazenadas a 45 °C por 15 dias.	51
Figura 18 - Lesões durante o ensaio de retração das feridas, tratadas com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel alginato-calêndula (tratamento) nos dias 2, 7, 14, 21 e 28.	52
Figura 19 - Retração das áreas das lesões (mm ²) dos animais tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel alginato-calêndula (tratamento) nos dias 2, 7, 14, 21 e 28	53
Figura 20 - Fotomicrografia da pele das lesões dos grupos tratados com hidrogel de alginato e hidrogel de alginato-calêndula nos dias 2, 7, 14, 21 (400x) e 28 (100x).....	54

Figura 21 - Infiltrado inflamatório nos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.....	57
Figura 22 - Macrófagos nos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.	58
Figura 23 - Vasos sanguíneos nos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.....	60
Figura 24 - Aspectos das fibras de colágeno tipo I e tipo III dos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14, 21 e 28	62
Figura 25 - Fibras colágenas Tipo III nas lesões dos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14, 21 e 28.	63
Figura 26 - Fibras colágenas Tipo I nas lesões dos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14, 21 e 28.	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 GERAL.....	11
2.2 ESPECÍFICOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 PELE.....	12
3.2 LESÕES CUTÂNEAS	14
3.3 CICATRIZAÇÃO.....	15
3.4 FERIDAS CRÔNICAS	19
3.5 CURATIVOS.....	21
3.6 ALGINATO.....	22
3.7 CALÊNDULA.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 ETAPAS DE TRABALHO.....	28
4.2 MATERIAL VEGETAL.....	28
4.3 EXTRATO DE <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> L.....	30
4.4 HIDROGÉIS.....	31
4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HIDROGÉIS.....	31
4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS	33
4.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO.....	34
4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	36
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização é um sistema biológico complexo que é ativado quando ocorre uma lesão tecidual com o objetivo de reconstituir a porção do tecido lesionado (BALBINO et al., 2005).

De acordo com o processo de cicatrização, as feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. As agudas são aquelas que se fecham espontaneamente dentro de um tempo esperado e sem complicações, enquanto as crônicas duram geralmente mais de três meses e progridem lentamente, apresentando processos de cicatrização retardados, interrompidos ou paralisados. Geralmente, as feridas crônicas estão associadas a doenças como diabetes e insuficiência venosa (KARRI et al., 2016). Como exemplos de feridas crônicas podem ser citados: lesões por pressão, úlceras do pé diabético, feridas infectadas e úlceras venosas.

A utilização de curativos pode auxiliar ou mesmo acelerar o processo de cicatrização de feridas. Entretanto, o alto custo de alguns curativos utilizados no tratamento de feridas crônicas ainda é um fator limitante de acesso para o paciente e também oneroso para o sistema de saúde (BUENO, 2010). Atualmente, há diversos curativos disponíveis no mercado, mas, ainda assim, observam-se diversas pesquisas sobre novos materiais e compostos ativos destinados ao tratamento de feridas.

Compostos sintéticos e naturais são utilizados na fabricação de curativos. Entre os diversos compostos naturais, os mais comuns são alginato, quitosana, pectina e gelatina. O alginato é um polissacarídeo que permite o preparo de diversos tipos de curativos como tecidos impregnados, hidrogéis, filmes e micropartículas, aos quais podem ser adicionados compostos cicatrizantes e anti-inflamatórios (DALLAN, 2005; KIM et al., 2008).

Os hidrogéis de alginato protegem a ferida, mantêm o ambiente úmido evitando o ressecamento do tecido, favorecem a angiogênese e promovem o desbridamento autolítico (SACKHEIM et al., 2006). Entretanto, as formulações de hidrogéis de alginato disponíveis no mercado não possuem compostos ativos ou extratos de plantas medicinais com ação cicatrizante.

Algumas espécies de plantas medicinais são recomendadas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira para o tratamento de feridas, entre elas estão *Aloe barbadensis* Mill. e *Calendula officinalis* L.

A *Calendula officinalis* L, popularmente conhecida como calêndula, apresenta propriedades anti-inflamatórias (KHALID et al., 2010; PREETHI et al., 2009), antimicrobianas (CHAKRABORTY, 2008), antioxidantes (BABAEE et al., 2013; UKIYA et al., 2006) e cicatrizantes (KHALID et al., 2010; UKIYA et al., 2006). No uso tópico, são utilizadas as infusões, tinturas e cremes contendo extratos das flores de calêndula. A atividade anti-inflamatória da calêndula está relacionada ao efeito cicatrizante (BRASIL, 2014).

Apesar das evidências dos efeitos cicatrizantes de extratos e produtos com calêndula, não há estudos sobre o efeito da calêndula quando combinada com o alginato. Este trabalho apresenta o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação do efeito cicatrizante de um hidrogel de alginato contendo extrato de calêndula em lesões cutâneas induzidas cirurgicamente na região dorsal de ratas Wistar.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito cicatrizante de um hidrogel de alginato contendo extrato de calêndula.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar as propriedades físico-químicas e a estabilidade dos hidrogéis de alginato-calêndula;

Avaliar o efeito sobre a retração de lesões cirúrgicas induzidas em ratas Wistar tratadas com o hidrogel de alginato-calêndula;

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

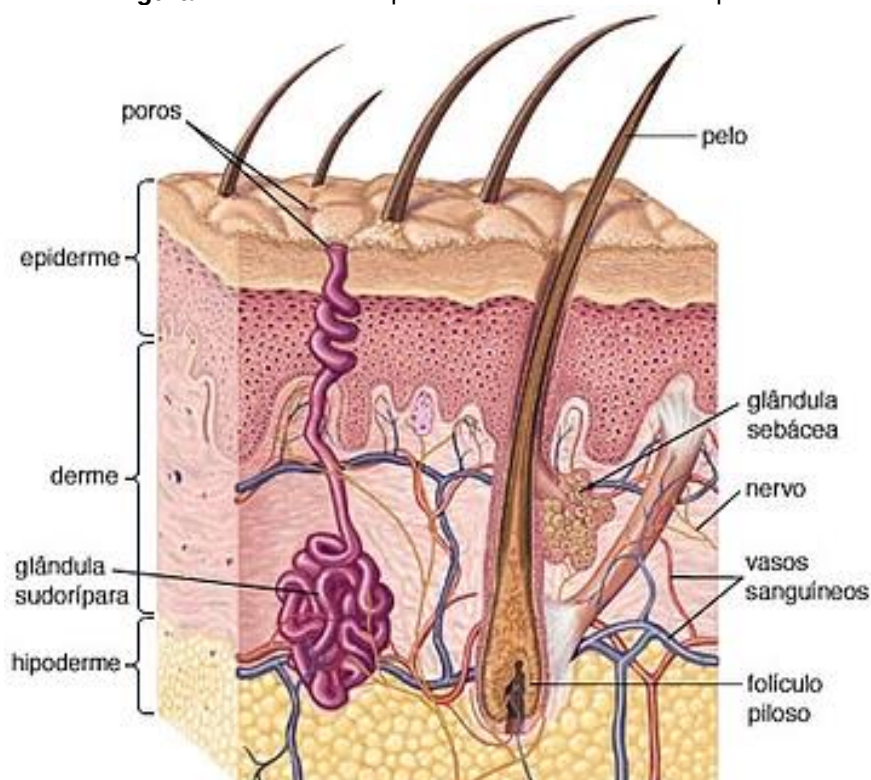
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PELE

A pele é considerada o maior órgão e recobre todo o corpo humano, protegendo-o contra o atrito, a desidratação, infecções e a radiação ultravioleta. Exerce funções na regulação da temperatura corporal, entrada e saída de eletrólitos, percepção sensorial (tato, calor, pressão e dor) e na síntese de vitamina D (KÜHNEL et al., 2012).

A pele e seus anexos constituem o sistema tegumentar (SILVA, 2011). Conforme ilustrado na Figura 1, é composta por duas camadas principais: a epiderme e a derme que se encontram sobre o tecido subcutâneo, a hipoderme (RODRIGUES, 2008; NERY, 2014).

Figura 1 - Desenho esquemático das camadas da pele



Fonte: (DERNOWSEK, 2020)

Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele e confere proteção contra a desidratação e atritos. Não é vascularizada e consiste de um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, onde os queratinócitos, células produtoras de queratina, estão presentes em grande quantidade. Além dos queratinócitos, também são encontradas diversas células com funções específicas e cruciais para o funcionamento adequado da pele, como melanócitos, células dendríticas, células de Langerhans e outras células do sistema imunológico, axônios sensoriais e a membrana basal dermo-epidérmica (DORANTES; AYALA, 2019).

Pode ser dividida em quatro camadas distintas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. A pele mais grossa apresenta ainda a camada lúcida (NERY, 2014).

Derme

A derme é a camada localizada abaixo da epiderme e está subdividida em duas camadas: derme papilar e reticular. A derme papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo e possui contato direto com a epiderme. A derme reticular, composta por tecido conjuntivo denso, é a camada mais espessa que fica em contato com o tecido subcutâneo (hipoderme) (PAUL; SHARMA, 2004).

A principal célula presente na derme é o fibroblasto, mas também podem ser encontrados macrófagos, mastócitos, células dérmicas apresentadoras de antígenos e células imunes residentes e circulantes. Além disso, a derme inclui o complexo da matriz extracelular (MEC) que fornece suporte para as conexões intercelulares, o movimento celular e regula as funções das citocinas e dos fatores de crescimento (DORANTES; AYALA, 2019).

Também são encontrados na derme os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas sensoriais livres ou encapsuladas (KÜHNEL et al., 2012).

Hipoderme

A epiderme e a derme encontram-se sobre a hipoderme (tecido subcutâneo), composta por tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, com função de isolamento térmico, absorção de choques mecânicos e modelagem corporal, devido à presença de células armazenadoras de gordura (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2016).

3.2 LESÕES CUTÂNEAS

A integridade da pele pode ser danificada por traumas, cortes, perfurações, escoriações, queimaduras e torções, seu efeito protetor acaba sendo comprometido e ocorre a formação de feridas (GARTNER; HIATT, 2007).

As feridas podem ser classificadas quanto à causa em cirúrgicas, traumáticas ou ulcerativas. Quanto ao conteúdo microbiano, podem ser classificadas como limpas (em condições assépticas), limpas contaminadas (tempo inferior de 6 horas entre trauma e atendimento, sem contaminação significativa), contaminadas (tempo de atendimento superior a 6 horas, sem sinal de infecção) e infectadas (presença de agente infeccioso ou intensa reação inflamatória, podendo conter pus) (MEIRELES; SILVA, 2008; SANTOS, 2016).

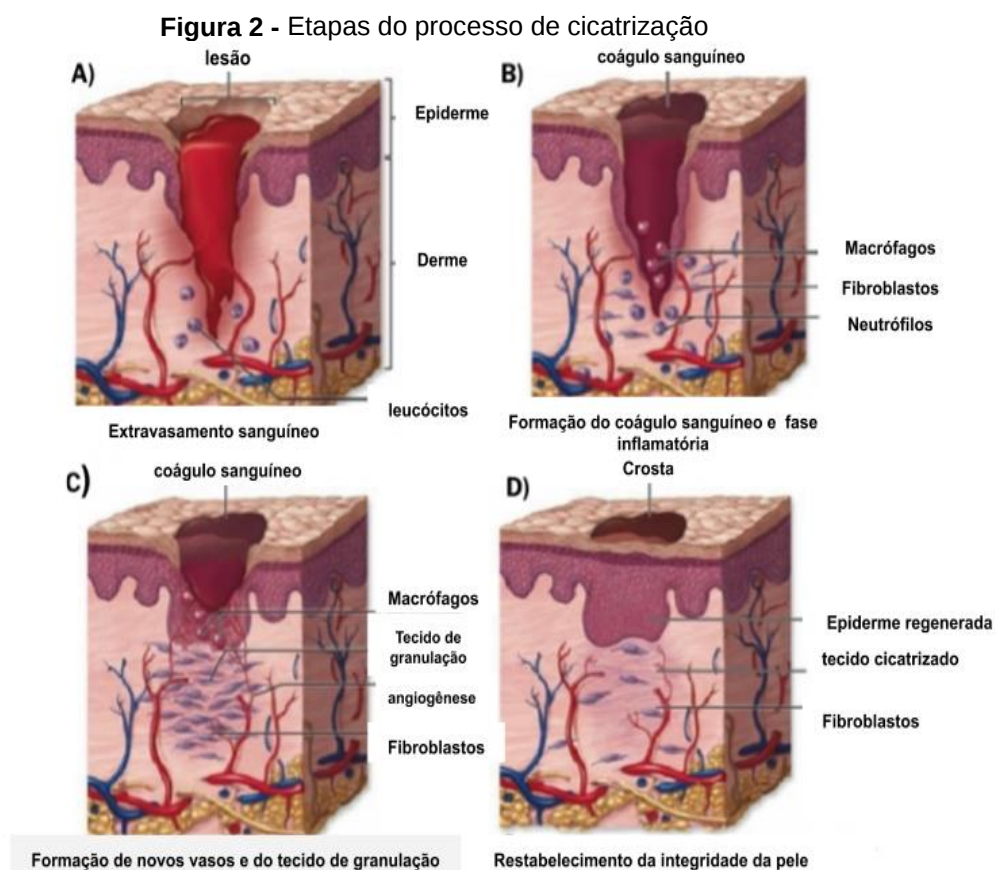
Quanto à morfologia, as feridas podem ser classificadas de acordo com as camadas atingidas em superficiais (atingem a derme), profundas superficiais (atingem o tecido subcutâneo) e profundas totais (chega a atingir os músculos) (BUENO, 2010; NERY, 2014).

Existem também três formas distintas de como as feridas podem cicatrizar e que dependem da quantidade de tecido lesionado e da presença ou não de infecção. De acordo com esses critérios, podem ser classificadas como: cicatrização por primeira intenção (não há perda de tecido e as bordas da ferida ficam justapostas), cicatrização por segunda intenção (perda de tecido e bordas não justapostas, cicatrizando mais lentamente) e cicatrização por terceira intenção (corrigidas cirurgicamente, normalmente crônicas sem resposta a tratamento usual). Ainda, de acordo com a apresentação, as feridas também podem ser definidas como abertas ou fechadas (BERGO et al., 2011; TAZIMA et al., 2008).

Nota-se ainda, uma tendência de classificação das feridas de acordo com o volume de exsudato em secas, moderadas ou altamente exsudativas (BERGO, 2011).

3.3 CICATRIZAÇÃO

Após uma lesão, a integridade da pele deve ser prontamente restaurada para manter suas funções. Em uma sequência de eventos complexos, células mononucleares do sangue periférico, células residentes da pele, matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas reguladoras participam do processo de cicatrização de uma ferida (DORANTES; AYALA, 2019). Conforme ilustrado na Figura 2, a cicatrização é dividida em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação.



Fonte: (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 2016, com modificações).

Legenda: (a) Após a lesão ocorre extravasamento de sangue, agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação; (b) formação do coágulo sanguíneo; as plaquetas liberam mediadores químicos que atraem neutrófilos sinalizando o início da inflamação; neutrófilos começam a ser substituídos pelos macrófagos que também liberam fatores de crescimento e iniciam a fase proliferativa; (c) angiogênese aumentada, formação do tecido de granulação e síntese de colágeno; (d) restabelecimento da integridade da pele.

Hemostasia

Hemostasia é a fase iniciada logo após a ocorrência da lesão. Ocorre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea, visando restabelecer a hemostasia, formar uma defesa contra infecções e organizar uma matriz provisória para a migração celular (EMING et al., 2007; WERNER; GROSE, 2003).

A lesão resulta na ruptura dos vasos e extravasamento sanguíneo; como consequência, ocorre a ativação plaquetária que leva à ativação da cascata de coagulação (SCHULTZ et al., 2011).

De início, ocorre uma vasoconstrição e o tamponamento do vaso rompido, por meio da formação de um trombo provisório resultante da adesão plaquetária. As plaquetas são importantes para a resposta inflamatória, pois liberam substâncias que são responsáveis por atrair e ativarem fibroblastos, células endoteliais e macrófagos (ENOCH; LEAPER, 2007). Além disso, as plaquetas liberam aminas vasoativas (ex. serotonina) que causam vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular permitindo a passagem de células importantes no processo de cicatrização (BROUGHTON et al., 2006).

A formação do tampão plaquetário tem a finalidade de atuar como uma matriz provisória até que ocorra a migração celular (monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais) para o local da lesão (HART, 2002; RAMOS; PIMENTEL, 2011). O coágulo formado impede a perda de fluidos e eletrólitos por meio da ferida, estabelecendo uma forma de barreira protetora contra contaminações externas, viabilizando a continuidade do processo de cicatrização (MONACO; LAWRENCE, 2003).

Dessa forma, a resposta inflamatória inicia-se com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a migração de células para a ferida por quimiotaxia (MEDEIROS; DANTAS, 2016).

Inflamação

O objetivo da fase inflamatória, liderada pelas células mononucleares do sangue periférico, é eliminar os patógenos e limpar a ferida (DORANTES; AYALA, 2019).

Os neutrófilos seguem as plaquetas como as principais células efetoras no início da fase inflamatória. O recrutamento de neutrófilos é iniciado por fatores de crescimento e quimiocinas liberadas por plaquetas ativadas no coágulo sanguíneo. Uma vez na ferida, os neutrófilos liberam mais mediadores neutrófilos-químioatrativos para continuar o recrutamento, tornando-se as células imunes mais abundantes na ferida. Ao chegarem, essas células aderem à parede do endotélio por meio de ligações aos receptores de membrana (selectinas) e produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana. Nesta etapa, a lesão apresenta-se caracteristicamente com rubor, edema, calor e dor; relacionados à vasodilatação e migração de neutrófilos para o local de lesão (SILVA, 2011).

Uma vez que toda contaminação tenha sido removida, a atividade dos neutrófilos muda gradualmente dentro de alguns dias; entram em processo de apoptose e gradativamente são substituídos pelos macrófagos (HART, 2002, CAMPOS et al., 2008).

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) e são rapidamente ativados em macrófagos teciduais (JANIS; HARRISON, 2014).

O aumento da permeabilidade vascular associados a fatores quimiotáticos promove também a diapedese dos macrófagos ao sítio da lesão que, por sua vez, liberam diversos componentes, enzimas e proteases que facilitam a própria migração. Os macrófagos migram para a ferida entre 48 e 96 h após a lesão e são as principais células efetoras do reparo tecidual, participando da remoção de bactérias, células mortas, neutrófilos apoptóticos, restos de tecidos e outros materiais estranhos (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 et al., 2008; GUO; DIPIETRO, 2010; JANIS; HARRISON, 2014).

Proliferação

O objetivo da fase proliferativa é reparar o dano da ferida e iniciar a

remodelação do tecido. É nessa fase que deve ocorrer o fechamento da lesão propriamente dito, caracterizado pelo desenvolvimento de um novo tecido, chamado de tecido de granulação, que consiste de leito capilar, fibroblasto, macrófagos e rede de colágeno, além de outros compostos (GEOVANINI et al., 2008; DIAS, 2011).

A fase proliferativa é identificada por (a) fibroplasia, incluindo proliferação de fibroblastos e diferenciação em miofibroblastos, deposição de matriz extracelular e contração da ferida, (b) reepitelização e interação epitelial-mesenquimal entre queratinócitos e fibroblastos, (c) angiogênese, incluindo proliferação de células endoteliais e formação de novos vasos e (d) reparo de nervos periféricos, consistindo em reinervação colateral e regeneração de nervos. Os macrófagos são as células inflamatórias dominantes que orquestram a fase proliferativa do reparo de feridas cutâneas (DORANTES; AYALA, 2019).

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos, necessários para suportar o ambiente de cicatrização da ferida. A fibroplasia ocorre paralelamente à revascularização da ferida e os fibroblastos se dividem e produzem componentes da matriz extracelular (MEDEIROS; DANTAS, 2016).

A matriz extracelular desempenha um papel fundamental no processo de reepitelização. Simultaneamente, uma interação parácrina ativa entre queratinócitos, fibroblastos, neutrófilos, monócitos-macrófagos e células endoteliais aumenta a quantidade de citocinas, fatores de crescimento e outras biomoléculas para promover a interação epitelial-mesenquimal entre queratinócitos e fibroblastos (DORANTES; AYALA, 2019).

Com o aumento da proliferação tecidual, ocorre o estímulo para a substituição da matriz provisória de fibrina pelo tecido de granulação que tem como função proteger a região lesionada até que ocorra a epitelização, formando uma barreira contra infecções. Os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, aumentando a deposição de colágeno, iniciando a contração da ferida (HOSGOOD, 2006; BROUGHTON et al., 2006).

Remodelação

O objetivo da fase final é completar a remodelação do tecido e restaurar a

integridade da pele. Ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal (GEOVANINI et al., 2008).

Nessa fase, já pode ser observada a contração inicial da ferida com ordenação centrípeta, tanto em profundidade como em extensão de toda a espessura da lesão, devido à redução da densa rede de capilares de fibroblastos e reordenação das fibras de colágeno (PETZ, 2015). O número de células e vasos sanguíneos diminui e as fibras de colágeno sofrem um rearranjo; ocorre a remodelação do colágeno e a regressão endotelial (NERY, 2014).

O tecido de granulação sofre um processo de diminuição gradual. A epiderme, a vasculatura dérmica e os nervos são remodelados, formando um tecido funcional. Os componentes vasculares dos fibroblastos e miofibroblastos do tecido de granulação diminuem e as células sofrem apoptose ou deixam a ferida. Da mesma forma, as quantidades de proteoglicanos e glicosaminoglicanos que exercem papel estrutural e de hidratação são diminuídas. As metaloproteinases liberadas por fibroblastos e macrófagos degradam o colágeno Tipo III do tecido de granulação e o substituem por colágeno Tipo I que, posteriormente, é reorganizado em fibrilas paralelas, formando uma cicatriz. O tecido cicatricial pode atingir até 80% da resistência tênsil, mas nunca será idêntica à do tecido original (DORANTES; AYALA, 2019).

A cicatrização adequada de uma ferida ocorre quando não há contaminação microbiana e a formação do tecido cicatricial é mínima, evitando alterações estruturais, acompanhada de reduzida produção de tecido necrótico (MAYET et al., 2014). Para que esse resultado seja alcançado, é imprescindível uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares (FALEIRO et al., 2009). Porém, nem todas as feridas cicatrizam de forma rápida e sem complicações, como é o caso de feridas crônicas (PETZ, 2015).

3.4 FERIDAS CRÔNICAS

Logo após uma agressão à pele, desde uma lesão mais superficial até as mais profundas, ocorre o início de processos específicos para a cicatrização e reparo tecidual. Essa reestruturação da pele é desencadeada por mecanismos complexos, em que vários fatores extrínsecos (frio, calor, umidade) ou intrínsecos

(doenças crônicas, imunidade comprometida, nutrição) contribuem ou retardam a regeneração da pele (COELHO, et al. 2010).

As feridas são usualmente classificadas em agudas ou crônicas; as últimas demandam maior tempo no processo de cicatrização, usualmente acima de 21 dias. As doenças crônicas e sistêmicas, tais como diabetes, hipertensão arterial, obesidade, desnutrição, imunodeficiência e infecções são as principais causas de retardo no processo de reparação tecidual (SILVA, 2011).

Milhões de pessoas no mundo sofrem com feridas crônicas. Em pacientes com diabetes, a cicatrização prejudicada é uma das principais causas de complicações, podendo levar à amputação dos pés e das pernas. Em condições diabéticas, feridas com níveis elevados de mediadores inflamatórios e condições de estresse oxidativo causam a degradação de colágeno (KARRI et al., 2016).

A cicatrização em feridas crônicas permanece tipicamente paralisada na fase inflamatória, afetando as atividades normais dos pacientes e diminuindo a qualidade de vida. Essas lesões têm diferentes etiologias, como úlceras diabéticas, venosas ou por pressão e, em particular, úlceras crônicas nos membros inferiores; todas com enormes implicações sociais e econômicas. São feridas crônicas clinicamente conhecidas as úlceras venosas e arteriais da perna, úlceras de pressão e as úlceras do pé diabético (FRYKBERG; BANKS, 2015).

No Brasil, as feridas crônicas constituem um sério problema de saúde pública, afetando uma parcela da população, em especial os adultos e idosos, interferindo na capacidade funcional e contribuindo para elevação de índices de morbidade e mortalidade por doenças crônicas (ABREU et al., 2013). Essa situação é um desafio para o sistema de saúde pois requer a atenção frequente e os cuidados por parte dos profissionais de enfermagem com a troca periódica de curativos. Outros agravantes são o custo elevado dos curativos e a limitada adesão ao tratamento (SILVA, 2011).

Em feridas crônicas, a cicatrização é interrompida na fase inflamatória ou proliferativa e o tecido adquire características que dificultam a continuidade do processo. Há o acúmulo de metaloproteinases, collagenases e elastases que degradam prematuramente o colágeno e os fatores de crescimento. Observa-se também um microambiente hipóxico (baixa tensão de oxigênio), levando à proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, ao aumento da fibrose tecidual.

Além disso, a formação de um biofilme e a propensão a ser colonizado por bactérias e fungos são fatores que retardam o processo de cicatrização (KARRI et al., 2016).

3.5 CURATIVOS

Embora a reparação tecidual na cicatrização seja regulada sistemicamente, é necessário favorecer as condições adequadas para viabilizar o processo fisiológico (COELHO et al., 2010).

Os curativos são uma das formas de tratar as feridas cutâneas e a escolha depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Atualmente, são inúmeras as opções de curativos existentes no mercado. Quatro critérios são avaliados para a escolha do tipo de curativo a ser utilizado na ferida: o tecido do leito da lesão, a presença de infecção, a quantidade de umidade (relacionada à produção de exsudato) e as bordas da ferida (BERGO et al., 2011).

Os curativos podem ser utilizados com diferentes finalidades no tratamento de feridas como: higienização, desbridamento, controle de infecção bacteriana, absorção de exsudato, estímulo à granulação e proteção da reepitelização. Materiais como gaze, algodão e bandagens são estruturalmente simples e não estimulam o processo de cicatrização. De modo geral, o tratamento de feridas crônicas é longo e o preço de curativos especiais (alginato de cálcio e prata, esponja de colágeno, espuma de poliuretano) é um dos fatores que mais impactam no custo final (SMANIOTTO et al., 2012).

O crescimento do emprego de biomateriais na medicina é expressivo. No setor de curativos, busca-se por materiais destinados ao tratamento de lesões de pele que apresentam como características a facilidade de aplicação e remoção, conforto ao paciente, manutenção da umidade adequada no leito da ferida e um custo-benefício atrativo (OKUMA, 2013).

Biomateriais são compostos não medicamentoso que podem ser usados para substituir ou suplementar a função dos tecidos e órgãos do corpo (RAKHORST; PLOEG, 2008). Esses compostos são capazes de permanecer em contato com fluidos corporais e tecidos por longos períodos de tempo com mínimas reações adversas (HENESS; BEN-NISSAN, 2004).

Polímeros naturais, sintéticos e semissintéticos também são capazes de auxiliar na cicatrização de feridas. Alguns curativos são confeccionados com polímeros naturais biodegradáveis e biocompatíveis encontrados em algas marinhas e fungos. Entre os polímeros utilizados na confecção de curativos estão: alginato, colágeno, amido, gelatina, quitosana e quitina (KIM et al., 2008). A principal vantagem dos biopolímeros é o fato de serem bem tolerados pelo organismo, pois apresentam semelhanças químicas e biológicas com os tecidos do corpo humano (RATNER et al., 1996).

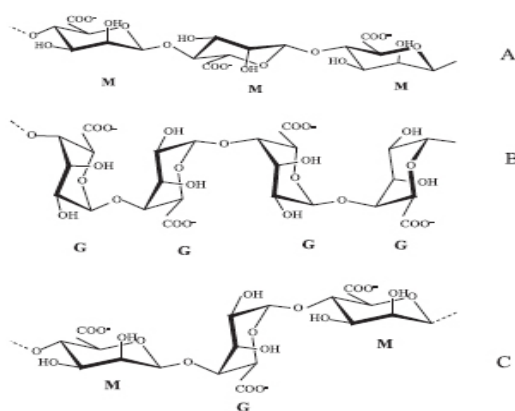
Os curativos de polímeros naturais na forma de hidrogéis podem conter princípios ativos e são considerados promissores na administração controlada de analgésicos, fatores de crescimento, antimicrobianos e anti-inflamatórios (AOYAGI et al., 2007).

3.6 ALGINATO

Alginatos são polissacarídeos aniônicos amplamente distribuídos na parede celular de algas marrons, incluindo espécies do gênero de *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Eclonia*, *Lessonia*, *Durvillaea* e *Sargassum* (PAUL; SHARMA, 2004; DRAGET et al., 2006; NESIC, et al., 2017).

Quimicamente (Figura 3), o alginato é formado por copolímeros lineares organizados em blocos de ácido D-manurônico (bloco M) e ácido L-gulurônico (bloco G), unidos por ligações glicosídicas.

Figura 3 - Estruturas moleculares de sequências de subunidades de ácido gulurônico e ácido manurônico presentes no alginato



Fonte: (CRUZ et al., 2008).

Legenda: (a) Blocos M - ácido manurônico; (b) Blocos G - ácido gulurônico; (c) Blocos MG - ácido manurônico e gulurônico.

A quantidade de resíduos M e G, assim como a respectiva sequência é o que determina as características físicas do alginato, bem como o seu potencial de gelificação. Os blocos MG, por exemplo, formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em baixos valores de pH, enquanto a estabilidade do gel está diretamente relacionada ao conteúdo de blocos G. Uma grande quantidade de grupamentos M torna a rede mais flexível, enquanto o oposto ocorre quando há uma grande quantidade de grupos G na composição do polímero (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

O alginato possui aplicações nas indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica, cosmética, agrícola e na engenharia de tecidos (MENEGUSSI et al., 2014; GEORGE; ABRAHAM, 2006)

Na indústria farmacêutica, o alginato tem aplicação no revestimento de cápsulas, em sistemas de liberação prolongada de fármacos e na fabricação de curativos de feridas cutâneas (SILVA, 2013).

O efeito de filmes curativos de alginato contendo gel de babosa foram avaliados na cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas (KOGA et al., 2018) e queimaduras (KAWAHARA, 2018) realizadas na região dorsal de ratos Wistar. Os resultados desses estudos mostraram um efeito benéfico na cicatrização, sendo possível observar uma menor quantidade de infiltrado inflamatório, aumento da angiogênese durante a fase proliferativa e maior produção de fibras colágeno tipo I (KOGA et al., 2018). Outro estudo com um filme de alginato-aloe reticulado com cloreto de zinco apresentou uma modulação na fase inflamatória, aumento da angiogênese na fase proliferativa e de colágeno tipo I, sugerindo que o gel de aloe combinado com íons de zinco contribuiu para o processo de cicatrização com melhora na formação da cicatriz (KOGA et al., 2020).

Dentre as diversas aplicações do alginato, está a utilização na forma de hidrogéis para o tratamento de lesões, auxiliando no desbridamento autolítico de feridas (ZAHEDI et al., 2010).

O Hidrogel é um gel aquoso (70 a 90% de água) transparente, incolor, formado por uma rede tridimensional de polímeros e copolímeros hidrofílicos. No uso tópico, os hidrogéis são utilizados principalmente para hidratar feridas secas, pouco úmidas e de média exsudação. Pela ação suavizante, são indicados principalmente para remoção de tecidos necróticos por meio do desbridamento

autolítico, promovido pela manutenção da umidade adequada no leito da ferida (SACKHEIM et al., 2006).

O desbridamento autolítico é a remoção de resíduos necróticos e tecidos desvitalizados de uma ferida pela ação de enzimas endógenas. A manutenção da hidratação do leito da ferida favorece a fibrinólise e consequentemente a ação de enzimas proteolíticas e colagenolíticas (metaloproteinases de matriz) sobre o esfacelo/tecido desvitalizado. É uma forma de desbridamento que requer um tempo maior para a remoção de tecido desvitalizado. A capacidade de dissolução do tecido necrótico pode ser mais efetiva com a utilização de curativos que mantenham a umidade no leito da úlcera, como um hidrogel, indicado para favorecer o desbridamento autolítico (BRASIL, 2002).

A cicatrização com o meio úmido tem as seguintes vantagens quando comparadas ao meio seco: prevenir a desidratação do tecido que leva à morte celular, acelerar a angiogênese, estimular a epitelização e a formação do tecido de granulação, facilitar a remoção de tecido necrótico, servir como barreira protetora contra microrganismos, diminuir a dor, evitar a perda excessiva de líquidos e de traumas na troca do curativo. Deve ser evitado o uso de hidrogéis de alginato em feridas com muito exsudato, pois o excesso de hidratação pode provocar a maceração do tecido ao redor da ferida (SACKHEIM et al., 2006).

O processo de hidratação da ferida não apenas estimula a cicatrização da pele, mas também alivia a dor pela umidificação de possíveis terminações nervosas expostas na lesão (SACKHEIM et al., 2006).

Os hidrogéis preparados com alginato podem conter na composição carboximetilcelulose, glicerol, propilenoglicol e são aplicados no tratamento de feridas secas ou com pouco exsudato (MORE et al., 2007)

Antes de disponibilizar um produto comercial na forma de um hidrogel curativo, é necessário avaliar as suas propriedades físico-químicas e a estabilidade, requisitos fundamentais em termos de qualidade e segurança. Produtos comerciais que apresentem problemas de estabilidade organoléptica, físico-química ou microbiológica, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade podem, ainda, colocar em risco a saúde do paciente, configurando uma infração sanitária (BRASIL, 2004).

3.7 CALÊNDULA

Calendula officinalis é uma planta herbácea originária dos países da Europa e utilizada no tratamento de feridas desde o século XIII (PARENTE et al., 2012) e, atualmente, praticamente em todo o mundo. O material vegetal de interesse farmacológico são os ligulados secos e as flores compostas (BRASIL, 2014).

A *Calendula officinalis* pertence à família Asteraceae, também conhecida como Compositae. No Brasil, é conhecida como calêndula, mal-me-quer, calêndula do campo, calêndula do jardim, mal-me-quer-dos-jardins, maravilha, margarida-dourada e calêndula de panela (BRASIL, 2014).

A calêndula possui flores pequenas e dispostas em capítulos, envolvidas por um involúcro de duas séries de brácteas. As flores da periferia são liguladas e pistiladas. As corolas são amareladas ou alaranjadas, com o limbo tridentado, apresentando quatro ou cinco nervuras e tubo curto coberto de tricomas. As flores do centro são escassas, tubulosas, pequenas, curtas, hermafroditas, amarelas ou alaranjadas, são raras avermelhadas, com corola quinquedentada (BRASIL, 2019), conforme a Figura 4.

Figura 4 - Flor da espécie *Calendula officinalis* L

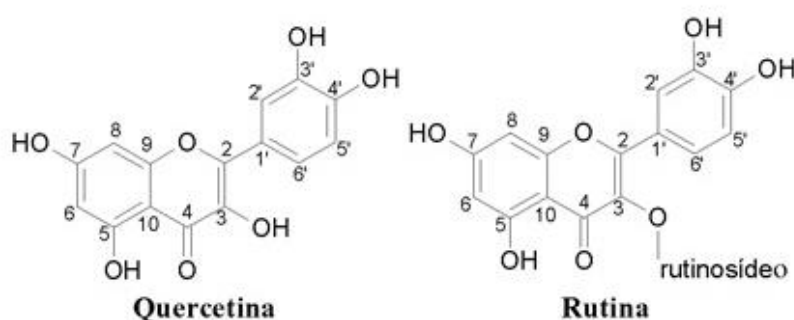


Fonte: (PATRO, 2013).

Os principais constituintes da calêndula são saponinas triterpênicas como ácido oleanólico e flavonoides, incluindo astragalina, hiperosídeo, isoquercitrina e rutina. Outros compostos incluem os óleos essenciais, sesquiterpenos e triterpenos (BRASIL, 2014).

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular com uma estrutura base C6-C3-C6 com carácter anfipático (MARTINEZ, 2002). A calêndula apresenta flavonoides em grande quantidade, representados por quercetina e rutina (Figura 5). São os compostos responsáveis pelas propriedades antioxidantes, antiinflamatória, anticarcinogênica, antiviral e ativação do sistema imunológico. Entre as principais ações, destaca-se a remoção de radicais livres, exercendo um papel citoprotetor em situações de risco de dano celular (BEHLING et al., 2004).

Figura 5 - Estrutura molecular dos flavonoides quercetina e rutina



Fonte: (VELLOSO et al., 2009)

No Brasil, muitas plantas medicinais são usadas na forma de extratos brutos, infusões, tinturas e emplastos no tratamento de infecções (HOLETZ et al., 2002).

O extrato de *C. officinalis* está presente em várias formulações cosméticas. No estudo do efeito cicatrizante, geralmente utiliza-se o extrato bruto ou cremes contendo o extrato (CHANDRAN; KUTTAN, 2008).

Os extratos obtidos das flores da calêndula possuem várias propriedades biológicas como antimicrobiana (FARIA et al., 2011), anti metastática (PREETHI et al., 2010), antiparasitária (SZAKIEL et al., 2008) e anti-inflamatória (AKIHISA et al., 1996). A atividade anti-inflamatória (PARENTE et al., 2012) foi observada em modelos animais (PREETHI; KUTTAN, 2009) e testes clínicos, justificando-se sua utilização em produtos cosméticos e no tratamento de feridas (GRIMME; AUGUSTIN, 1999).

No Brasil, o uso do extrato de flores de calêndula está regulamentado pela RE nº 89 de 16 de março de 2004 da ANVISA. A calêndula é utilizada para o tratamento de afecções de pele, como cortes superficiais, inflamação da pele e

mucosas, eritemas, queimaduras, gengivite, artrite e como cicatrizante. Outros usos, descritos na medicina tradicional, mas não fundamentados em estudos pré-clínicos ou clínicos, incluem o tratamento de amenorreia, febre, angina, gastrite, hipotensão, icterícia, reumatismo e vômitos (BRASIL, 2014).

A calêndula também apresenta potencial para ser utilizada no controle e prevenção de dislipidemias e doenças associadas, podendo reduzir o risco cardiovascular (FONTES, 2015).

O uso da calêndula acelera o processo de cicatrização no tratamento pós-operatório ou pós-traumático (PARENTE et al., 2009). Okuma (2013) desenvolveu emulsões com gel à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliou a atividade cicatricial de úlceras cutâneas em ratos. O extrato bruto da calêndula demonstrou baixa citotoxicidade *in vitro* e o gel promoveu uma melhora da cicatrização no modelo de úlcera cutânea. A modulação do processo de cicatrização na fase inflamatória foi considerada como o fator essencial para a total reepitelização do tecido.

Em outro estudo, animais tratados com pomada de calêndula tiveram melhora na cicatrização das feridas quando comparados ao grupo controle (FERREIRA et al., 2013). Sugere-se que o óleo de calêndula poderia ser utilizado para tratar lesões por queimaduras térmicas, dermatites agudas (POMMIER et al., 2004), na radioterapia do câncer de mama e em erupções cutâneas (PARENTE et al., 2012).

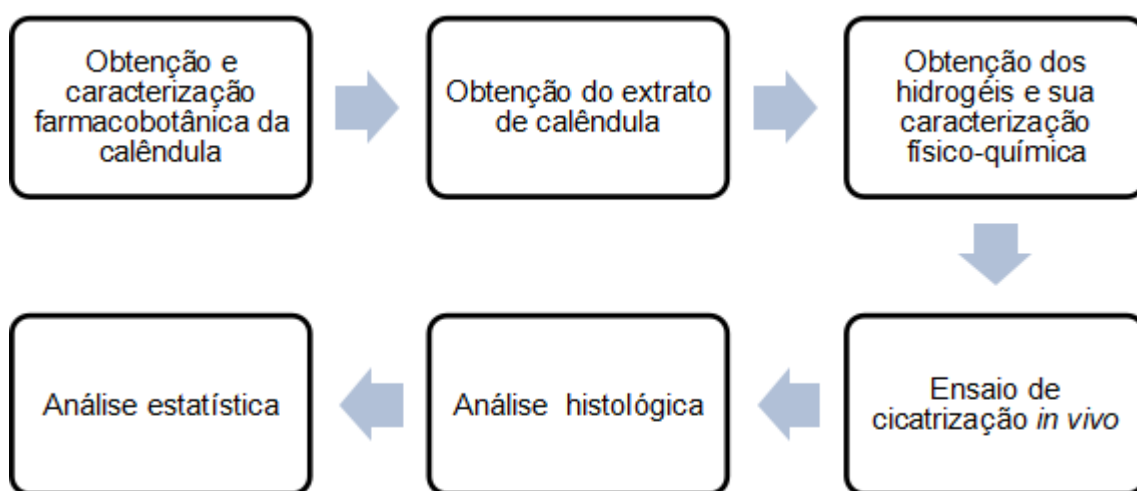
A fração butanólica do extrato de *Calendula officinalis* possui significativa atividade de eliminação de radicais livres e antioxidante (CORDOVA et al., 2002). Um estudo em mulheres com câncer de mama submetidas à radioterapia evidenciou que o uso de uma pomada de calêndula, aplicada na pele pelo menos duas vezes ao dia, reduziu o número de casos de dermatite severa, caracterizada por irritação da pele, vermelhidão e dor (POMMIER et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ETAPAS DE TRABALHO

Os procedimentos experimentais seguiram as seguintes etapas, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 - Etapas da pesquisa



Fonte: A autora.

4.2 MATERIAL VEGETAL

Obtenção do material vegetal

As flores secas de *Calendula officinalis* L foram adquiridas no comércio local em embalagens de plástico de 30 gramas da marca Chamel, número do lote 4326 (Figura 7). As embalagens foram abertas somente no momento do uso.

Figura 7 - Flores de *Calendula officinalis* L.



Fonte: A autora.

Legenda: (a) Embalagem do produto comercial com flores de *Calendula officinalis* L; (b) Flores secas de calêndula.

Avaliação botânica das flores de calêndula

O material botânico foi avaliado conforme preconizado na monografia da calêndula da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2014). As flores foram cortadas em pequenos fragmentos. Na sequência, foram hidratados, imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (2%) para diafanização e corados com fucsina. As lâminas contendo o material foram analisadas com microscópio binocular para identificação de estruturas anatômicas características da espécie vegetal.

Perda por dessecação (PD)

As flores secas de calêndula foram reduzidas até um pó fino por trituração. No ensaio foi utilizado um pesa-filtro previamente limpo e seco a 100 ° C, mantido por 30 minutos no dessecador antes da pesagem da amostra. O pesa-filtro contendo 2,0 g do pó das flores de calêndula foi levado à estufa à 105 ° C até peso constante (BRASIL, 2014). A porcentagem de PD foi calculada pela equação:

$$PD = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Pa = peso da amostra

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra depois da dessecação

Doseamento de flavonoides totais nas flores de calêndula

O teor de flavonoides totais foi determinado por espectrofotometria na região do visível por complexação com cloreto de alumínio. Os resultados foram expressos em percentual de flavonóides totais, calculados como hiperosídeo ($C^{21}H^{20}O^{12}$). O método consiste no preparo das soluções amostra e branco após o processo de extração do material botânico com acetato de etila, obtendo-se a solução estoque. Para preparar as soluções foram seguidos os procedimentos descritos na monografia da calêndula da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2014). A solução amostra foi obtida pela mistura de 10 mL da solução estoque, 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em solução metanólica de ácido acético 5% (v/v) e o volume completado para 25 mL com a solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol. A solução branco foi preparada utilizando-se 10 mL da solução estoque e o volume completado para 25 mL com solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol. Após 30 minutos, a absorbância da solução amostra foi determinada em 425 nm, utilizando-se a solução branca para ajuste do zero. O teor de flavonoides totais foi calculado pela equação:

$$TFT = \frac{A \times 1,25}{(m - PD)}$$

A = absorbância da solução amostra;

m = massa da droga vegetal (g);

PD = perda por dessecação (% p/p).

4.3 EXTRATO DE *Calendula officinalis* L.

Preparo do extrato

As flores secas de calêndula foram reduzidas até um pó fino e uma fração do pó deixada em maceração por 2 semanas. Em seguida, os extratos foram filtrados e armazenados em frasco âmbar.

Doseamento de flavonoides nos extratos

O doseamento foi realizado pelo método espectrofotométrico por complexação com cloreto de alumínio. Para preparar a solução amostra, utilizou-se 1,0 g do extrato, 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (m/v) em solução metanólica de ácido acético 5% (v/v) e o volume completo para 10 mL com a solução metanólica de ácido acético. A solução branco foi preparada de maneira similar, mas sem a adição da solução de cloreto de alumínio. Após 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância em 425 nm. O teor de flavonoides foi calculado pela equação de regressão obtida de uma curva de calibração utilizando quercetina como padrão.

4.4 HIDROGÉIS

Preparo dos hidrogéis

Após os ensaios preliminares de desenvolvimento das formulações, foram selecionados dois hidrogéis de alginato para os ensaios posteriores: 1) hidrogel de alginato sem adição de extrato de calêndula (controle); 2) hidrogel de alginato contendo extrato das flores de calêndula (hidrogel alginato-calêndula).

No preparo dos hidrogéis, utilizou-se alginato de sódio para o preparo de uma solução com concentração previamente selecionada, dissolvendo-se em água deionizada contendo conservantes. O hidrogel alginato-calêndula foi obtido pela mistura da solução de alginato com um volume apropriado do extrato de calêndula. Os detalhes experimentais de composição, proporções e preparo dos hidrogéis foram omitidos por questões de proteção da propriedade intelectual.

4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HIDROGÉIS

Logo após o preparo os hidrogéis foram armazenados em frascos âmbar e mantidos em temperatura ambiente. Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: pH, densidade, viscosidade, espalhabilidade; e análises de estabilidade: centrifugação e teste de estabilidade preliminar.

pH

Os valores de pH dos hidrogéis foram determinados com um medidor potenciométrico de pH. A calibração do aparelho foi feita com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 e as amostras foram diluídas a 10% (p/p) com água deionizada, conforme preconizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004) para produtos semissólidos. As medidas foram realizadas em triplicata.

Densidade

A densidade relativa dos hidrogéis foi determinada com o emprego de um picnômetro de 25 mL. O picnômetro foi pesado vazio, com água como líquido de referência padrão e com os hidrogéis. Os valores foram obtidos em triplicata e densidade relativa foi calculada utilizando as massas da água e das amostras.

Viscosidade

A viscosidade dos hidrogéis foram medidas utilizando-se um viscosímetro de Brookfield. As leituras foram padronizadas utilizando spindle S2 com rotações de 6, 12, 30 e 60 rpm com as amostras mantidas em temperatura ambiente. Os valores foram obtidos em triplicata e expressos em mPa.s (milipascal.segundo).

Espalhabilidade

As medidas foram realizadas sobre uma folha de papel milimetrado e as amostras submetidas ao espalhamento com lâminas de vidro com massas determinadas (Figura 8). Aplicou-se aproximadamente 50 mg da amostra no centro de uma lâmina de vidro posicionada sobre a folha de papel milimetrado. Uma outra lâmina de vidro com massa conhecida foi suavemente posicionada sobre a primeira lâmina contendo a amostra e, após 1 minuto, anotou-se o raio médio do círculo formado pelo espalhamento da amostra. O mesmo procedimento foi seguido, com intervalos de 1 minuto, adicionando-se pesos determinados sobre a lâmina. As análises de espalhabilidade foram realizadas em triplicata. Os

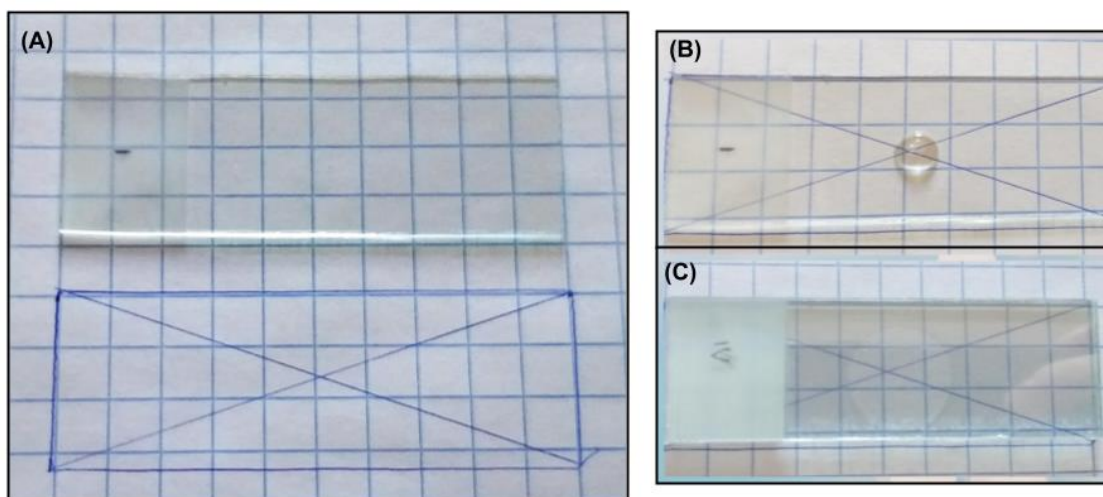
resultados foram expressos em espalhabilidade em função do peso aplicado. A determinação da espalhabilidade foi designada pela equação:

$$E_i = (d^2 \times \pi) / 4$$

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

d = diâmetro médio (mm)

Figura 8 - Teste de espalhabilidade



Fonte: A autora.

Legenda: (a) Lâmina de vidro e papel milimetrado tracejado com linhas diagonais; (b) Amostra de hidrogel sobre a lâmina de vidro na posição central; (c) Aplicação de lâminas sobre a amostra até o peso máximo.

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

Centrifugação

Seguindo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004) procedeu-se à realização do teste de centrifugação dos hidrogéis. Cada amostra (10 g) mantida à temperatura ambiente foi colocada em tubos tipo Falcon e submetida à centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos.

Teste de estabilidade preliminar

As amostras dos hidrogéis foram submetidas a diferentes condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Após o teste de centrifugação, as formulações dos hidrogéis foram submetidas a

diferentes temperaturas de armazenamento (5 ± 2 °C, 25 ± 2 °C e 45 ± 2 °C por 15 dias) mantidas em embalagens (bisnagas metálicas e frascos de vidro) seladas. A seguir foram analisadas as características organolépticas (aspecto, cor, odor) e pH das formulações.

4.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO

Animais

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPG (processo 004885/2019). Os experimentos foram realizados utilizando-se 50 ratas fêmeas da linhagem Wistar provenientes do Biotério da UEPG, mantidos em gaiolas individuais em ambiente climatizado (22 ± 2 °C) com ciclos claro/escuro de 12h. Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam comida e água *ad libitum*.

Ooforectomia

O procedimento consiste na retirada dos ovários, foi realizado em ratas com 12 semanas de idade. Os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de cetamina (40 mg/kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Após, foi realizada a tricotomia seguida de antissepsia com PVPI a 1% (m/v). A retirada das gônadas foi feita por incisões de 0,5 cm em cada flanco. O ovário foi pinçado com pinça hemostática, seguido da ligadura da artéria ovariana com fio absorvível 4-0. Os animais foram acompanhados por um tempo de 8 semanas e apenas após esse período foi realizado o procedimento experimental de cicatrização.

Procedimento de cicatrização *in vivo*

O efeito cicatrizante do hidrogel alginato-calêndula foi avaliado pelo modelo de lesões induzidas cirurgicamente. Foram utilizadas 50 ratas distribuídas em 2

grupos (n = 25): 1) grupo tratado com hidrogel de alginato (controle) e 2) grupo tratado com hidrogel de alginato-calêndula.

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram sedados com cloreto de xilazina (1,0 mg/kg IM), e indução e manutenção com cetamina (30 mg/kg IM). Foi realizada a tricotomia seguida de assepsia com álcool 70 %. A lesão cirúrgica de 4 cm² foi padronizada e produzida com o auxílio de um bisturi na região cervico-dorsal das ratas Wistar, o suficiente para atingir a epiderme e a derme. Em seguida, as lesões dos animais dos grupos 1 e 2 foram tratadas com hidrogel de alginato e hidrogel de alginato-calêndula, respectivamente. Cabe destacar que no nosso estudo o hidrogel de alginato serviu como um controle positivo; assim, os dois grupos foram tratados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam 1 mL do hidrogel uma vez ao dia por até 7 dias.

Nos dias 2, 7, 14, 21 e 28 do pós-cirúrgico, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados com inalação de isoflurano. Os fragmentos de pele do local da lesão foram retirados com o auxílio de um bisturi e fixados em formol 10% por 24 horas para uma posterior análise histológica.

Análise da retração das lesões

Para avaliar a retração das lesões, foram tiradas fotos da área da lesão dos animais eutanasiados nos dias 2, 7, 14, 21 e 28, com parâmetros padronizados como suporte, posição do animal, distância e pixels. Foi utilizada uma câmera fotográfica de 13 megapixels, mantendo-se uma distância fixa de 20 cm. Posteriormente a área da ferida foi medida com o software ImageJ. Os resultados foram expressos como a retração da área original da ferida (mm²).

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Preparo das lâminas histológicas

Os cortes previamente fixados em formol 10% por 24 horas e armazenados em álcool 70% foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina líquida e secos em temperatura ambiente. Na sequência, cortes realizados com espessura de 5 micrômetros foram fixados em lâminas de vidro com albumina e secos em temperatura ambiente, para posterior coloração com hematoxilina-eosina (HE) e picrosirius red. As lâminas coradas foram montadas com resina e lamínula e armazenadas para posterior análise.

As lâminas contendo os cortes histológicos da pele do local da lesão dos animais dos dois grupos (eutanasiados nos dias 2, 7, 14, 21 e 28) coradas com HE para análise histológica quantitativa e qualitativa de infiltrado inflamatório e angiogênese foram observadas e fotografadas com microscópio Olympus DP72 com câmera acoplada e avaliados com auxílio do Software Cell counter ImageJ para contagem de células inflamatórias e vasos sanguíneos

A análise histológica das fibras colágenas foi realizada com amostras das lesões dos animais dos dois grupos eutanasiados nos dias 14, 21 e 28 corados utilizando-se picrosirius red em solução aquosa de ácido pícrico. As imagens foram obtidas em microscópio Olympus LG-PS2 e avaliadas com o auxílio do Software ImageJ, uma imagem binária foi obtida e a área proporcional de cada colágeno foi expressa em % pixels.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados com o auxílio do programa IBM SPSS Statistics 2.1. Foi realizado Teste t para amostras independentes ou não pareado, com intervalo de confiança em 95%.

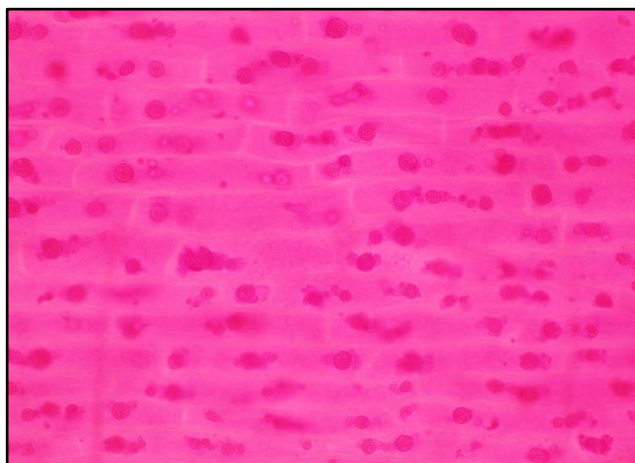
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

MATERIAL VEGETAL

Caracterização botânica *Calendula officinalis* L

Os cortes histológicos das flores de calêndula foram analisados por microscopia. O fragmento da corola (pétalas) em sua face adaxial da epiderme mostrou células retangulares, alongadas, de contorno levemente sinuoso, com cutícula estriada e destituída de estômatos (Figura 9).

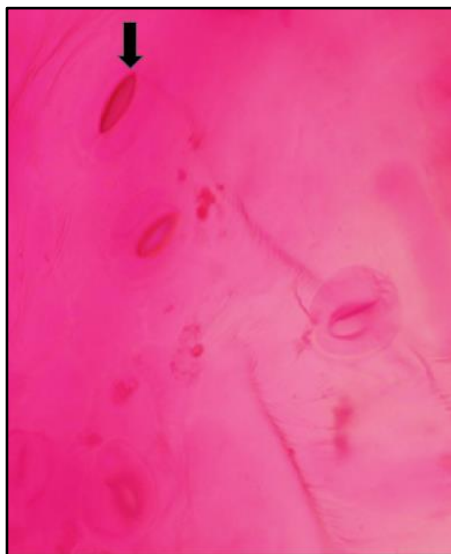
Figura 9 - Células da face adaxial da corola de *Calendula officinalis* L (fucsina; aumento 40x)



Fonte: A autora.

Na região da face abaxial observou-se células da epiderme semelhantes à da face adaxial, porém com 3 ou 4 estômatos anomocíticos (Figura 10).

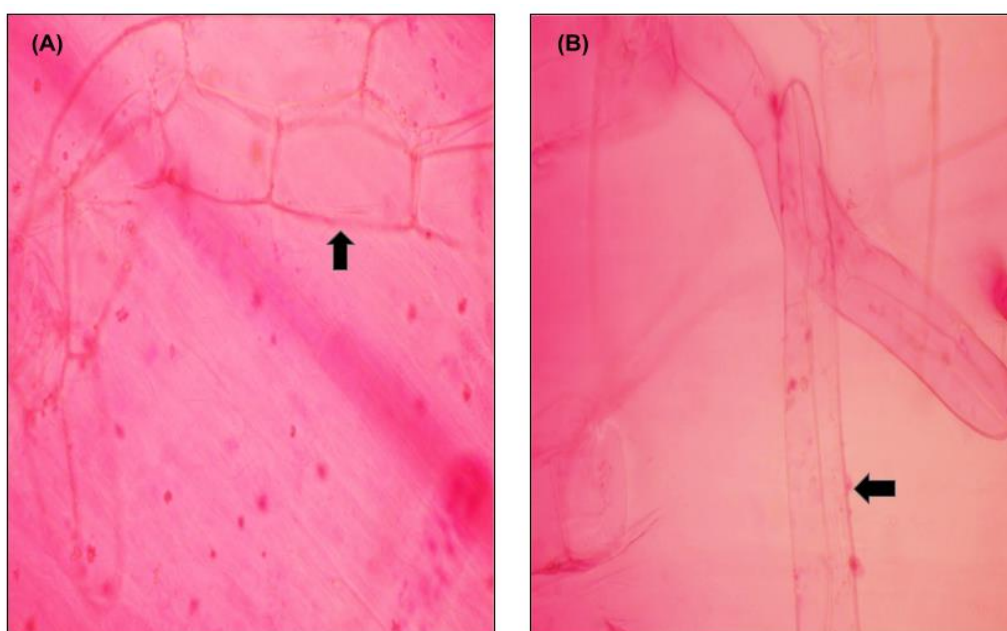
Figura 10 - Estômatos encontrados na face abaxial da corola de *Calendula officinalis* L (fucsina; 40x)



Fonte: A autora.
(->) indicando o estômato.

Observou-se também na face abaxial a presença de tricomas tectores longos, multicelulares, bisseriados, cônicos, de ápice arredondado e tricomas glandulares multicelulares, de pedicelo unisseriado, com três a cinco células, ou bisseriado, com três ou quatro células em cada fileira, ambos com cabeça ovalada, multicelular e bisseriada (Figura 11).

Figura 11 - Tricomas na face abaxial da corola de *Calendula officinalis* L. (fucsina; 40X)



Fonte: A autora.
Legenda: (a) tricomas tectores; (b) tricomas glandulares

Os resultados obtidos na análise microscópica dos cortes oriundos das flores utilizadas nos experimentos (produto comercial rotulado como calêndula) estão em conformidade com preconizado na monografia da espécie *Calendula officinalis* L. (BRASIL, 2014) e Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). A verificação da autenticidade do material vegetal é primordial no desenvolvimento de fitoterápicos pela existência de uma grande variedade de espécies de plantas com características botânicas semelhantes e a identificação de uma espécie pode ser realizada por ensaios macro e microscópicos (SOUZA et al., 2010).

Perda por dessecação

Esse ensaio destina-se a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições do teste. Os valores obtidos foram calculados pela equação descrita no procedimento experimental, que consiste na diferença de massa antes e após a secagem do material botânico em estufa.

A perda por dessecação no ensaio com as flores de *Calendula officinalis* L. foi de 11,7%. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL 2019), o máximo permitido para perda por dessecação é de 12,0%. Portanto, o resultado obtido está dentro do limite preconizado.

Doseamento de flavonoides totais nas flores de calêndula

O resultado é fornecido em porcentagem (p/p) de flavonoides totais calculados como hiperosídeo ($C^{21}H^{20}O^{12}$). A média das absorbâncias medidas foi de $0,181 \pm 0,007$ e o teor médio de flavonoides totais encontrado foi de 0,64%. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), a quantidade de flavonoides preconizada é de no mínimo 0,40%. O teor de flavonoides é um importante indicador do teor de princípios ativos nas flores de calêndula e para a padronização de extratos.

Os flavonoides são produtos do metabolismo secundário que, além de desempenharem funções específicas na planta, são marcadores ativos importantes da sua ação farmacológica. Na averiguação da qualidade de determinadas

espécies de plantas medicinais, os flavonoides devem ser encontrados em teores preconizados pela literatura científica (BRASIL, 2014).

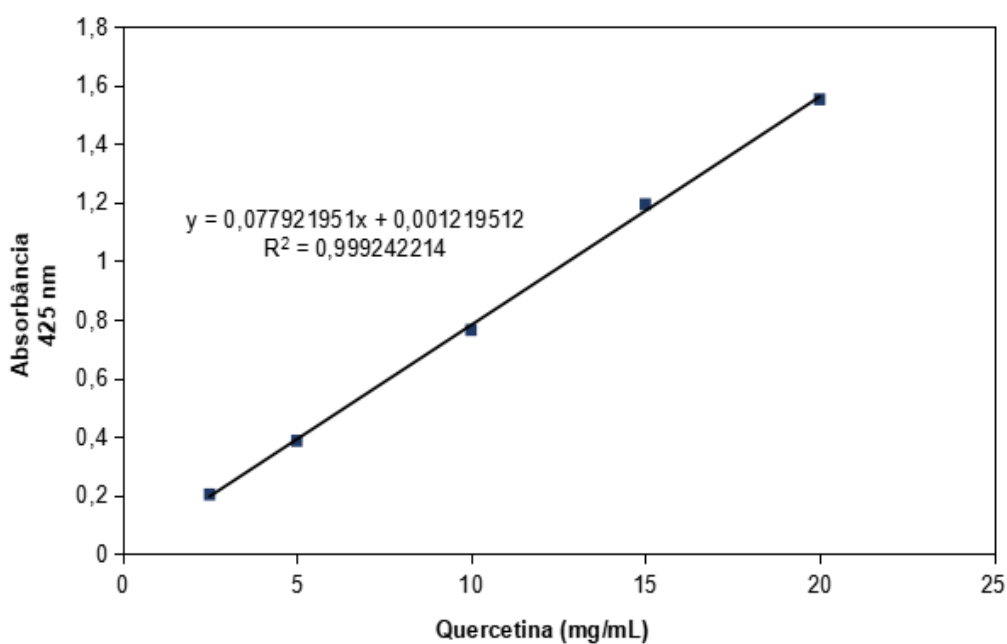
Fatores genéticos, ambientais, período de coleta, condições de armazenamento e contaminações por microrganismos alteram os teores dos compostos fitoquímicos, o que pode comprometer as propriedades terapêuticas (SKOULA et al., 2000; CARVALHO-FILHO et al., 2006). A quantificação dos teores de marcadores fitoquímicos específicos é fundamental para garantir o uso seguro e racional das plantas medicinais e dos produtos fitoterápicos.

EXTRATOS

Doseamento de flavonoides dos extratos

O teor de flavonoides nos extratos foi expresso em quercetina, conforme a curva analítica obtida com a substância padrão de referência. A equação da reta da curva de calibração foi $A = 0,0779 x + 0,0012$ ($r^2 = 0,9992$), onde A é a absorbância em 425 nm e x a concentração (Figura 12).

Figura 12 - Curva de calibração de quercetina



Fonte: A autora.

A partir da equação da reta obtida com quercetina obteve-se o conteúdo de flavonoides dos extratos de *Calendula officinalis* L, expresso em mg de quercetina/mL de extrato, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de flavonoides nos extratos expressos em quercetina

Extratos de Calêndula	Absorbância média $\pm$ s	Quercetina (mg/mL) $\pm$ s	Teor %
Extrato 1	0,098 nm $\pm$ 0,002	1,24 $\pm$ 0,02	0,12
Extrato 2	0,199 nm $\pm$ 0,006	2,54 $\pm$ 0,07	0,25
Extrato 3	0,312 nm $\pm$ 0,003	3,98 $\pm$ 0,04	0,40

Fonte: A autora.

Vale ressaltar que os resultados apresentados estão expressos em termos de flavonoides totais, calculados como quercetina e não como hiperosídeo, conforme expresso para as flores de calêndula.

O extrato de calêndula (3), obtido com maior proporção de flores apresentou maior proporção de flavonoides (0,4%), portanto foi utilizado no preparo dos hidrogéis de alginato. Os extratos de calêndula são empregados em diversas formas farmacêuticas fitoterápicas, principalmente para uso dermatológico. Conforme as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004), os extratos das flores de calêndula são utilizados em preparações de uso tópico, como anti-inflamatório e cicatrizante, cujas propriedades têm sido atribuídas em grande parte aos flavonoides (HAMBURGER et al., 2003; KHALID; SILVA, 2010).

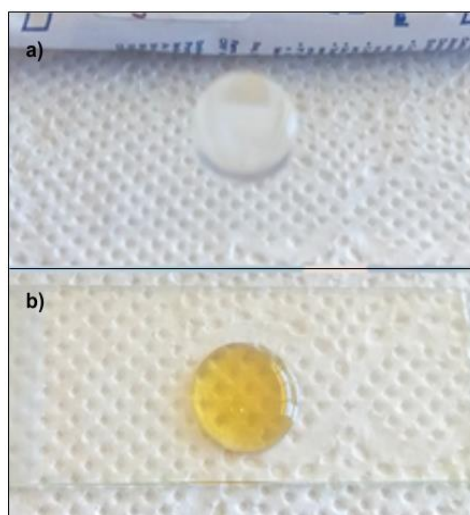
A análise quantitativa de marcadores químicos é fundamental para o controle de qualidade de matérias-primas vegetal e fitoterápico, uma vez que garante a padronização dos teores de compostos ativos e a consequente eficácia e a segurança dos medicamentos (BARA et al., 2004). Pacheco (2007) afirma que no mercado brasileiro a grande maioria das matérias-primas vegetais de calêndula possui teor de flavonoides entre 0,05 a 0,1% e os fármacos que apresentam mais de 0,1% podem ser consideradas de boa qualidade.

HIDROGÉIS

Características organolépticas

Os hidrogéis de alginato apresentaram-se com aspecto semi-sólido, inodoro, translúcido e com estrutura homogênea à temperatura ambiente. Os hidrogéis de alginato-calêndula também apresentaram aspecto homogêneo e semi-sólido, conforme mostrado na Figura 13, mas com cor levemente amarelo-alaranjado e odor característico da calêndula.

Figura 13 - Hidrogéis de alginato



Fonte: A autora.

Legenda: (a) hidrogel de alginato; b) hidrogel de alginato-calêndula.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A avaliação físico-química é importante para identificar possíveis alterações na estrutura da formulação, nem sempre perceptíveis imediatamente após o preparo. Essas análises podem indicar problemas de estabilidade resultantes de interações entre os componentes ou decorrentes do processo de fabricação (BRASIL, 2004).

pH

Os valores de pH das formulações de hidrogéis estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios de pH dos hidrogéis

Formulações	pH média $\pm$ s
Solução de alginato de sódio	7,01 $\pm$ 0,01
Hidrogel de alginato (controle)	6,98 $\pm$ 0,02
Hidrogel de alginato-calêndula	6,09 $\pm$ 0,02

Fonte: A autora.

É possível verificar que o pH dos hidrogéis apresentam valores próximos da neutralidade (pH 7,0) e que a adição do extrato de calêndula reduz o pH do hidrogel. A diminuição do pH do hidrogel pode ser consequência da presença de compostos com propriedades ácidas no extrato de calêndula.

A determinação dos valores de pH é de grande importância em formulações tópicas. O pH natural da pele é ligeiramente ácido. Esse manto ligeiramente ácido existente na pele e parte de água do filme hidrolipídico que protege as camadas externas é essencial como barreira protetora da pele. Isso permite neutralizar agressores alcalinos, inibir o crescimento de bactérias, restaurar e manter o ambiente ácido ideal para a microflora natural da pele. Se o pH da pele se tornar alcalino, o equilíbrio natural é perturbado (UNSONST, 2016).

Verifica-se que as feridas agudas cicatrizam em meio ligeiramente ácido, como uma resposta fisiológica temporária, resultante de vários fatores: produção de ácido láctico, aumento da exigência de O_2 e diminuição da perfusão tecidual, com aumento local de CO_2 (MENOITA; SANTOS et al., 2011). Essa acidose é fisiológica e beneficia o processo de cicatrização.

O pH é importante no controle do microambiente das feridas crônicas, pois o pH do leito das feridas crônicas encontra-se na faixa de 7,15 a 8,9 (MENOITA; SANTOS et al., 2011). Todas as feridas que apresentam um pH mais alcalino têm períodos de cicatrização mais longos (MENOITA; SANTOS et al., 2011).

O pH da superfície cutânea é responsável por proteger a pele contra bactérias e fungos e ainda contra infecções, alergias, irritações e coceiras. Isso

ocorre porque o pH encontra-se levemente ácido, variando de 4,8 a 5,8, importante para promover a função de barreira adequada, atividade microbiana, estrutura e maturação do estrato córneo (GONÇALVES et al., 2017).

Um produto com o pH próximo da pele é pouco agressivo e, muitas vezes, é considerado um hidratante. Quanto mais distante do valor do pH natural, mais agressivo é o produto porque provoca um desequilíbrio na pele (DAREZZO, 2017). O pH ideal de uma formulação tópica varia de 5,5 a 8,0. Um valor específico é padronizado de acordo com a estabilidade dos componentes, dos compostos ativos utilizados e da tolerância biológica (AULTON, 2005).

O pH do tecido de uma ferida é essencial para que as funções celulares ocorram adequadamente e pode ser afetado por secreções e certos antissépticos. Portanto, deve-se avaliar criteriosamente o uso de produtos aplicados no tratamento de feridas (MORE et al., 2007). De modo geral, considera-se que um pH mais baixo, próximo do normal, é favorável para a cicatrização de feridas; portanto o hidrogel de alginato-calêndula possui um pH adequado ao uso como cicatrizante.

Densidade

A densidade relativa dos hidrogéis foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de densidade dos hidrogéis após o preparo

Formulações	Densidade relativa (g/mL)
Solução de alginato de sódio	1,020 ± 0,008
Hidrogel de alginato (controle)	1,053 ± 0,010
Hidrogel alginato-calêndula	1,050 ± 0,008

Fonte: A autora.

Nota-se que a densidade relativa é ligeiramente maior nos hidrogéis controle e alginato-calêndula comparada com a solução de alginato. Essas formulações possuem composição semelhante, uma vez que hidrogel controle também contém o solvente extrator utilizado na obtenção do extrato de calêndula o que explica a densidade praticamente idêntica. Não há padronização de valores ideais de

densidade para hidrogéis de uso dermatológico e os valores apenas indicam a influência dos componentes e das respectivas proporções na formulação.

Viscosidade

A viscosidade dinâmica dos hidrogéis foi avaliada e os resultados estão na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis

Velocidade viscosímetro (rpm)	Solução de alginato de sódio	Hidrogel alginato (controle)	Hidrogel alginato- calêndula
6 rpm	0,169	0,158	0,158
12 rpm	0,108	0,098	0,097
30 rpm	0,058	0,048	0,047
60 rpm	0,040	0,035	0,034

Fonte: A autora.

Pode-se verificar que a solução de alginato de sódio apresenta viscosidade ligeiramente maior quando comparado aos hidrogéis alginato e alginato-calêndula, a diminuição da viscosidade pode ser justificada pela presença de solvente ou do extrato na composição das formulações dos hidrogéis. A viscosidade determina a fluidez do produto e pode influenciar não apenas características como espalhabilidade e sensação na pele, mas também pode afetar a penetração dos compostos ativos incorporados na formulação.

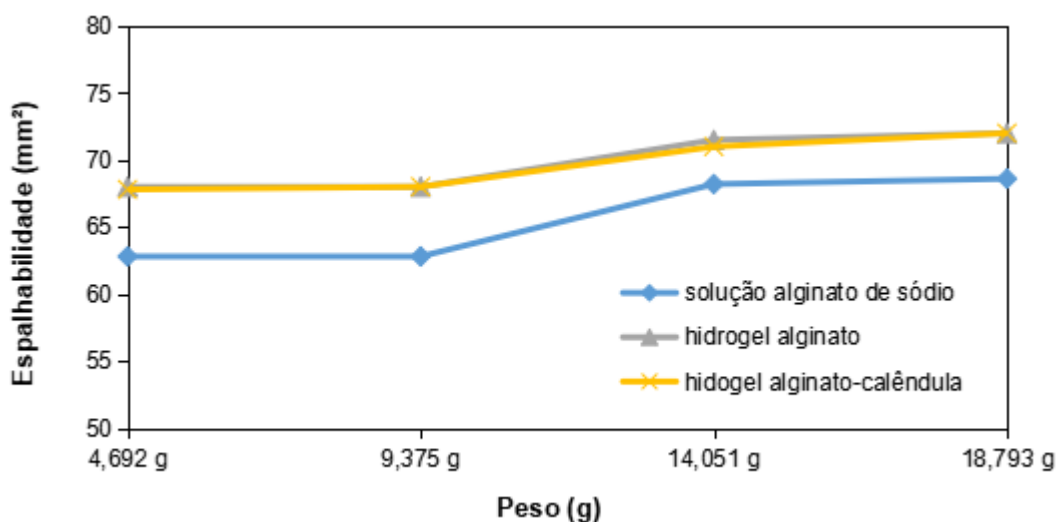
Espalhabilidade

O teste de espalhabilidade baseia-se na resistência ao movimento forçado. Os resultados desse teste correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite, relação que corresponde ao fator de espalhabilidade.

A espalhabilidade é definida basicamente como extensão, ou seja, expansão que uma formulação atinge sobre uma superfície após a aplicação em um determinado tempo (BORGHETTI; KNORST, 2006). É uma das características essenciais das formas farmacêuticas destinadas ao uso tópico.

O teste de espalhabilidade das formulações com a adição sucessiva de pesos conhecidos permitiu avaliar o espalhamento dos hidrogéis de acordo com o aumento do raio da área da amostra comparado com o valor inicial. A partir dos valores de raios médios obtidos foram calculadas as áreas de superfícies correspondentes, conforme apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Espalhabilidade das formulações em relação ao peso adicionado



Fonte: A autora.

Nota-se que a espalhabilidade está diretamente relacionada à viscosidade das formulações. Ao contrário da solução de alginato de sódio, a espalhabilidade é maior nos hidrogéis alginato e alginato-calêndula que possuem menor viscosidade. Para Giarola (2015), a espalhabilidade é uma característica importante para o tipo de formulação proposta, sendo responsável pela transferência correta da dose do fármaco no local de aplicação.

Uma menor espalhabilidade da formulação pode ser considerada uma característica positiva, visto que diminui a possibilidade de movimentação da formulação no local de aplicação e oferece possibilidade de aumento da concentração da substância veiculada pela formulação do hidrogel no local de aplicação. Entretanto, esse aspecto deve ser avaliado por meio de outros ensaios.

ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

O perfil de estabilidade de um produto serve para avaliar o seu desempenho, segurança e eficácia, além de sua aceitação pelo consumidor. Tem por objetivo fornecer indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente às condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2004).

Centrifugação

Todos os hidrogéis mantiveram-se estáveis durante o teste de centrifugação. O objetivo do teste é produzir estresse à formulação, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas. O teste de centrifugação é realizado como análise preliminar com a finalidade de detectar características de instabilidade das formulações e indicativo da necessidade de reformulação (BRASIL, 2004). A instabilidade das formulações caracteriza-se pela separação dos componentes, facilmente observado macroscopicamente na forma de separação de fases, formação de *caking* (aglomerado) ou coalescência. Não foram observadas alterações no seu aspecto original das amostras. Portanto, as formulações avaliadas apresentaram-se estáveis e ideais para a continuidade dos demais testes de estabilidade.

ESTABILIDADE PRELIMINAR

Características organolépticas

Como parte do estudo da estabilidade dos hidrogéis, foram realizadas avaliações das características organolépticas ao longo do tempo em diferentes temperaturas de armazenamento. Os parâmetros avaliados foram cor, odor e aspecto. Os resultados da avaliação organoléptica estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8, conforme as diferentes temperaturas de armazenamento.

Os ensaios organolépticos fornecem parâmetros que permitem avaliar, de imediato, o estado em que se encontra a amostra em estudo por meio de análises

comparativas, com o objetivo de verificar alterações como separação de fases, precipitação e turvação no reconhecimento primário do produto (BRASIL, 2004).

Segundo a normativa do manual da ANVISA (BRASIL, 2004), quando se avalia o aspecto das formulações submetidas ao armazenamento em diferentes condições, o produto deve manter-se íntegro e com o aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, em que pequenas alterações são aceitáveis. Com relação à cor e ao odor, as formulações devem permanecer estáveis por no mínimo 15 dias, e pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas mais elevadas.

As formulações foram analisadas quanto ao aspecto, cor e odor e classificadas como segue: (IM) intensamente modificada, (M) modificada, (LM) levemente modificada e (N) para normal, isto é, sem alteração quanto ao aspecto original (BRASIL, 2004).

Tabela 6. Avaliação macroscópica dos hidrogéis armazenados à 5 °C por 15 dias

Formulações	1 dia	7 dias	15 dias
Solução de alginato de sódio	N	N	N
Hidrogel alginato (controle)	N	N	N
Hidrogel alginato-calêndula	N	N	N

Fonte: A autora.

Ao avaliar-se o comportamento das formulações quando submetidas ao armazenamento em geladeira, não foram observadas modificações nos parâmetros analisados.

Tabela 7 Avaliação macroscópica dos hidrogéis armazenados à 25 °C por 15 dias

Formulações	1 dia	7 dias	15 dias
Solução de alginato de sódio	N	N	N
Hidrogel alginato (controle)	N	N	LM
Hidrogel alginato-calêndula	N	N	LM

Fonte: A autora.

Quando as amostras foram avaliadas em temperatura ambiente observou-se pequenas alterações nas suas características organolépticas a partir do 15º dia de armazenamento. Os hidrogéis com extrato de calêndula apresentaram

alterações com intensificação da cor amarelo-alaranjada característica do produto, acompanhado de um ligeiro aumento da turbidez.

Tabela 8. Avaliação macroscópica dos hidrogéis armazenados à 45 °C por 15 dias

Formulações	1 dia	7 dias	15 dias
Solução de alginato de sódio	N	N	LM
Hidrogel de alginato (controle)	N	LM	LM
Hidrogel alginato-calêndula	N	LM	LM

Fonte: A autora.

Giarola (2015), apontou em seu estudo que formulações semi-sólidas sofrem ação do calor uma vez que temperaturas elevadas aceleram reações físico-químicas e químicas, ocasionando alterações na viscosidade, aspecto, cor e odor do produto. No presente estudo, ficou evidente a contribuição da elevação da temperatura (45 °C) em relação às alterações da cor, sendo mais acentuadas em comparação com as formulações armazenadas na geladeira e em temperatura ambiente.

De modo geral, ao avaliar-se o comportamento das formulações nas três condições, a melhor temperatura de armazenamento foi a de 5 ± 2 °C seguida da temperatura de 25 ± 2 °C. Porém, um estudo por tempo mais longo deveria ser realizado para observar a intensidade de tais alterações.

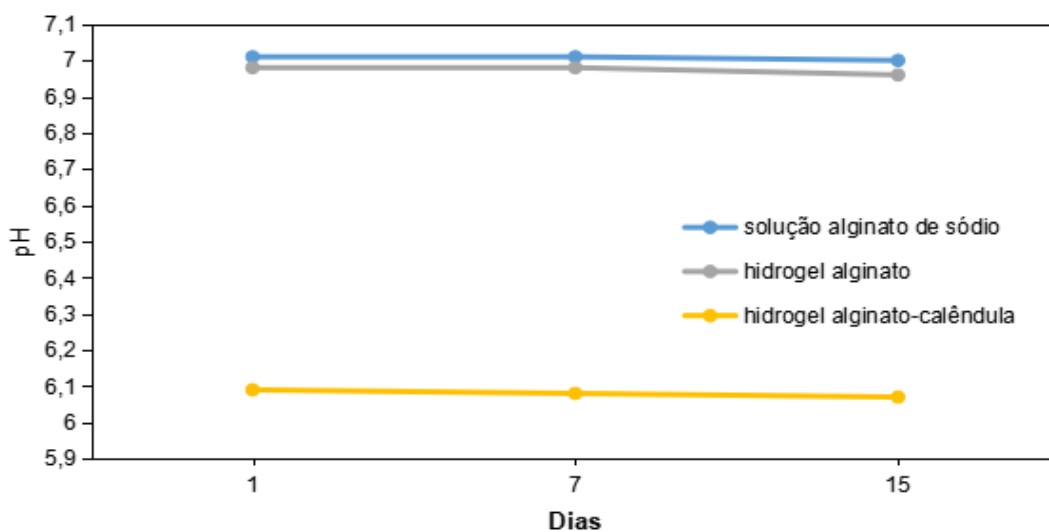
pH

Os valores de pH das formulações foram medidos logo após o preparo e após 7 e 15 dias nas diferentes temperaturas de armazenamento.

A medida do pH das formulações durante o tempo de armazenamento permite avaliar se o produto continua apropriado para uma formulação de uso tópico. As alterações de pH podem acontecer devido a condições inadequadas de transporte e armazenamento das formulações (FRANÇA et al., 2011).

Os resultados do estudo da variação do pH no decorrer do tempo estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17, conforme as temperaturas de armazenamento (5, 25 e 45 °C, respectivamente).

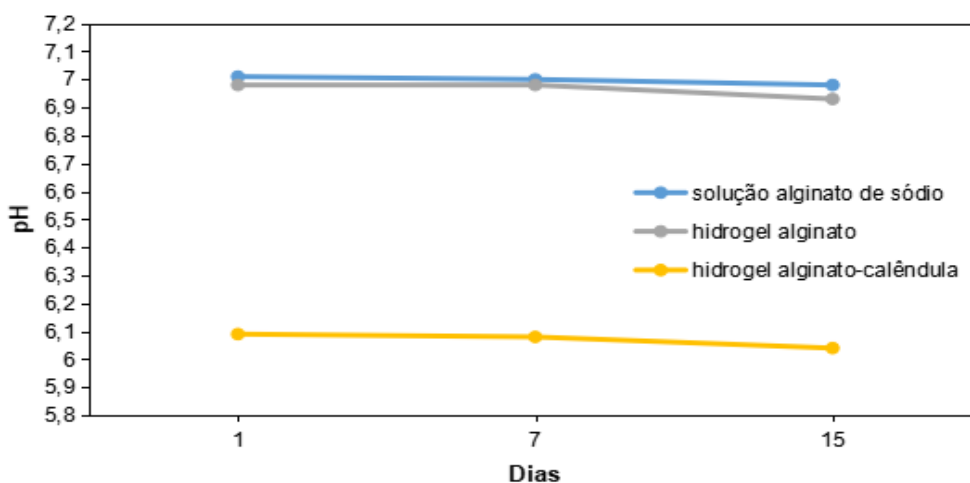
Figura 15 - Valores de pH das formulações armazenadas a 5 °C por 15 dias.



Fonte: A autora.

Observando os valores de pH das formulações quando armazenados a 5°C, notou-se mínimas alterações dos valores inerentes à técnica potenciométrica.

Figura 16 - Valores de pH das formulações armazenadas a 25 °C por 15 dias.

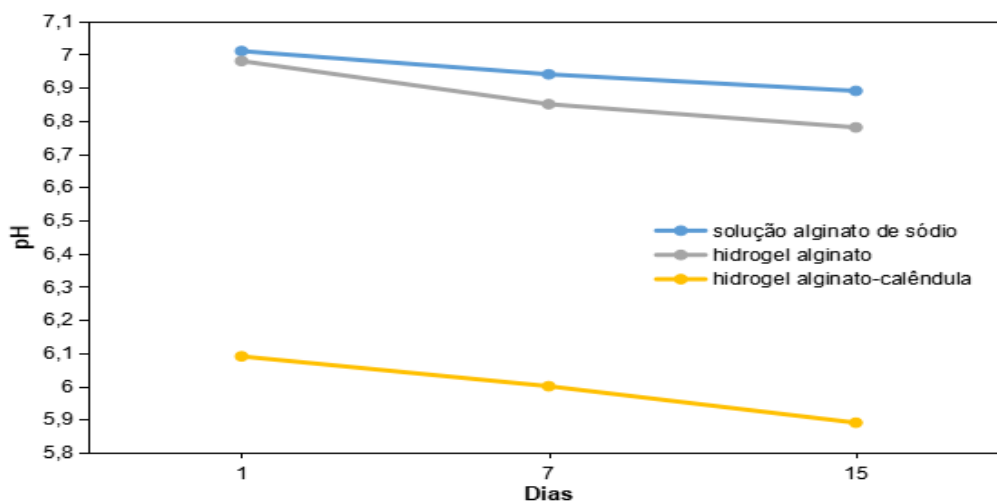


Fonte: A autora.

Segundo normativa da ANVISA (BRASIL, 2004) variações de valores de pH acima de 10% são consideradas inapropriadas, sendo esse o limite e um critério para exclusão de formulações. Dessa forma, todas as oscilações de pH encontradas nas formulações armazenadas à temperatura ambiente estão dentro dos valores preconizados como adequados.

Pode-se concluir, que as formulações mantidas em geladeira e temperatura ambiente possuem características adequadas em termos de estabilidade.

Figura 17 - Valores de pH das formulações armazenadas a 45 °C por 15 dias.



Fonte: A autora.

Notou-se uma redução nos valores de pH das amostras armazenadas em estufa a 45 ° C. Alterações de valores de pH acima de 10% são indicativos de comprometimento da integridade da formulação. Nas amostras em estudo, a diminuição do pH não atingiu esse percentual e os hidrogéis permaneceram estáveis mesmo quando mantidos na estufa a 45 ° C por 15 dias

Akhtar et al., (2010) afirmaram que uma redução de pH em diferentes condições de armazenamento pode ser decorrente da produção de algum metabólito ácido ou decomposição de um dos excipientes durante o processo de aquecimento.

ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO

Retração das lesões

A retração das lesões foi avaliada durante o período de cicatrização. A Figura 18 apresenta as imagens do aspecto geral das lesões dos animais dos diferentes grupos com o passar do tempo (2, 7, 14, 21 e 28 dias). As lesões não apresentaram sinais de edema ou infecção.

Observa-se uma redução progressiva das áreas da lesão e nitidamente uma diferença entre os grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14 e 21.

Figura 18 - Lesões durante o ensaio de retração das feridas, tratadas com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel alginato-calêndula (tratamento) nos dias 2, 7, 14, 21 e 28.

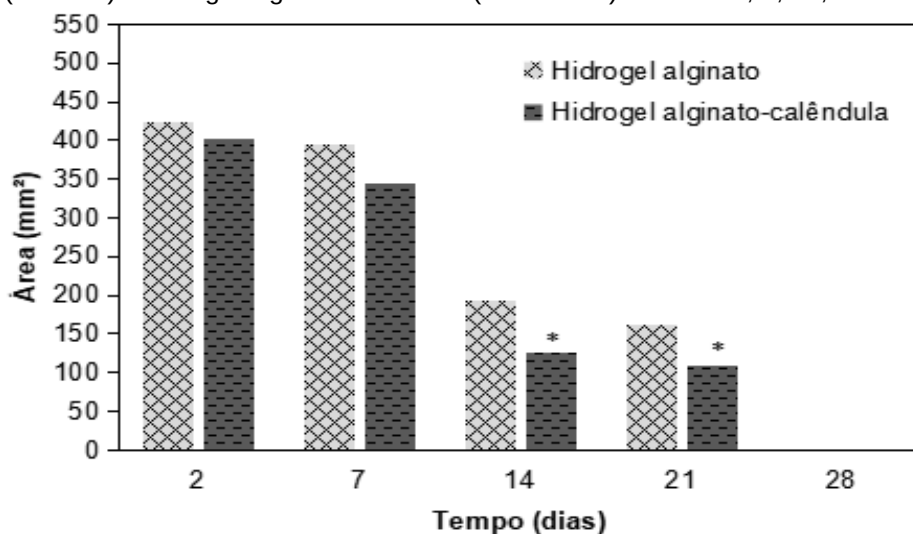


Fonte: A autora.

Em termos quantitativos, a retração das lesões, expressa pela área média das feridas, está ilustrada na Figura 19. Observa-se uma diferença estatística significativa e maior retração das feridas dos animais tratados com hidrogel de alginato-calêndula no 14º dia ($p= 0,005$) e 21º dia ($p= 0,05$).

Na perspectiva do tratamento de feridas, uma cicatrização mais rápida melhora significativamente a qualidade de vida dos portadores de lesões crônicas, deixando a pele flexível e sem dor durante o movimento e leva a um melhor resultado estético.

Figura 19 - Retração das áreas das lesões (mm²) dos animais tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel alginato-calêndula (tratamento) nos dias 2, 7, 14, 21 e 28



Fonte: A autora.

* $p \leq 0,05$ quando comparado ao controle.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após o ferimento, a hemostasia e a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios iniciam a fase inflamatória, com o recrutamento de granulócitos (células sanguíneas responsáveis por combater e eliminar as infecções), que removem o tecido morto e patógenos na área da ferida (DORANTES; AYALA, 2019).

A análise qualitativa da cicatrização das lesões evidenciou, nos dias 2 e 7 do pós-cirúrgico, um denso infiltrado inflamatório em ambos os grupos (Figura 20 A e B), com gradual diminuição ao decorrer do tempo. No dia 14, o grupo tratado com o hidrogel alginato-calêndula apresentou menor quantidade de infiltrado inflamatório (Figura 20 F).

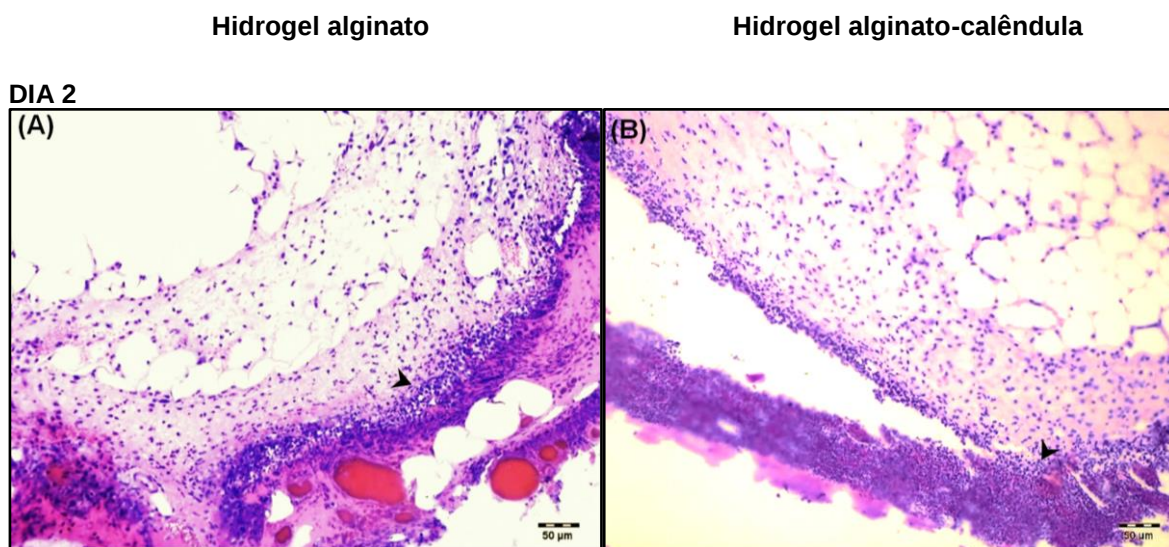
No dia 21, o grupo controle tratado com hidrogel de alginato apresentou maior quantidade de macrófagos (Figura 20 G), fato que pode estar relacionado a uma fase inflamatória mais tardia no processo de cicatrização. Uma inflamação temporária é benéfica no início da cura da ferida, enquanto uma fase inflamatória prolongada leva a feridas crônicas (GURTNER et al., 2008). Os macrófagos englobam restos celulares e secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (HENG, 2011). São 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).

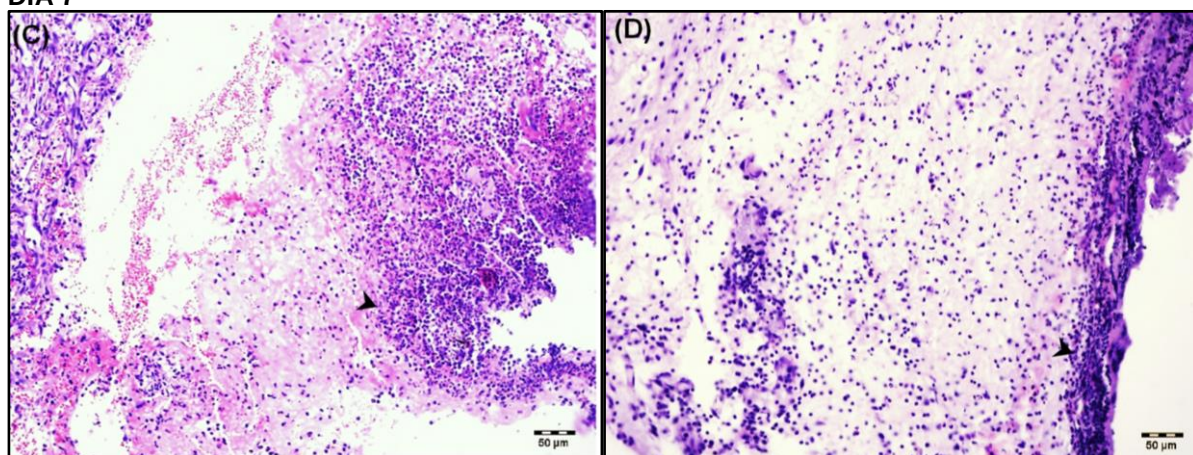
O objetivo da fase final da cicatrização, a remodelação, é restaurar a integridade da pele. O número de células e vasos sanguíneos diminui e as fibras de colágeno sofrem um rearranjo, ocorrendo assim uma regressão endotelial (NERY, 2014).

No presente estudo, no dia 14 observou-se o aumento da quantidade de vasos sanguíneos e fibroblastos em ambos os grupos (Figura 20 E e F). Nos dias 21 (Figura G e H) e 28 (Figura I e J), observa-se uma diminuição do infiltrado inflamatório e dos vasos sanguíneos nos dois grupos. E, ao final, no dia 28, as camadas da pele em ambos os grupos (Figura I e J) estavam completamente restabelecidas.

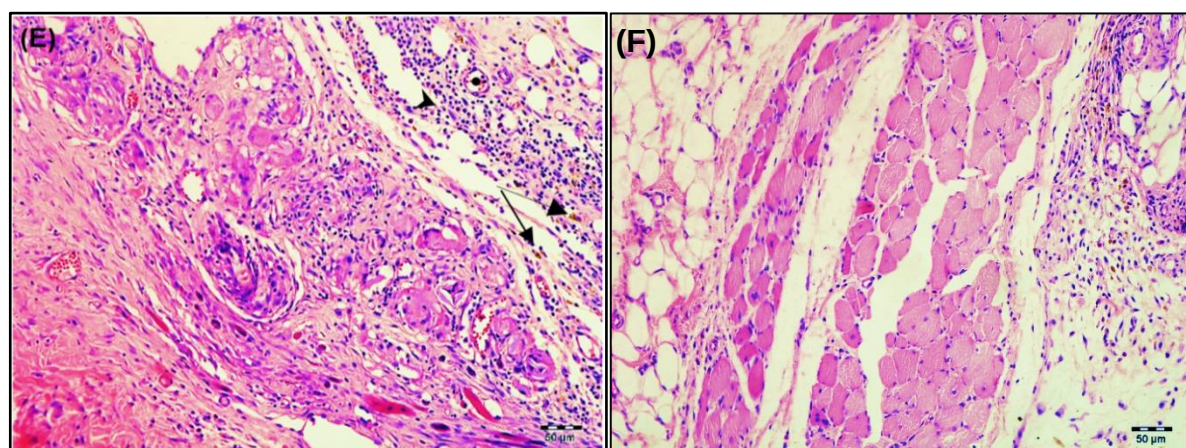
Figura 20 - Fotomicrografia da pele das lesões dos grupos tratados com hidrogel de alginato e hidrogel de alginato-calêndula nos dias 2, 7, 14, 21 (400x) e 28 (100x)



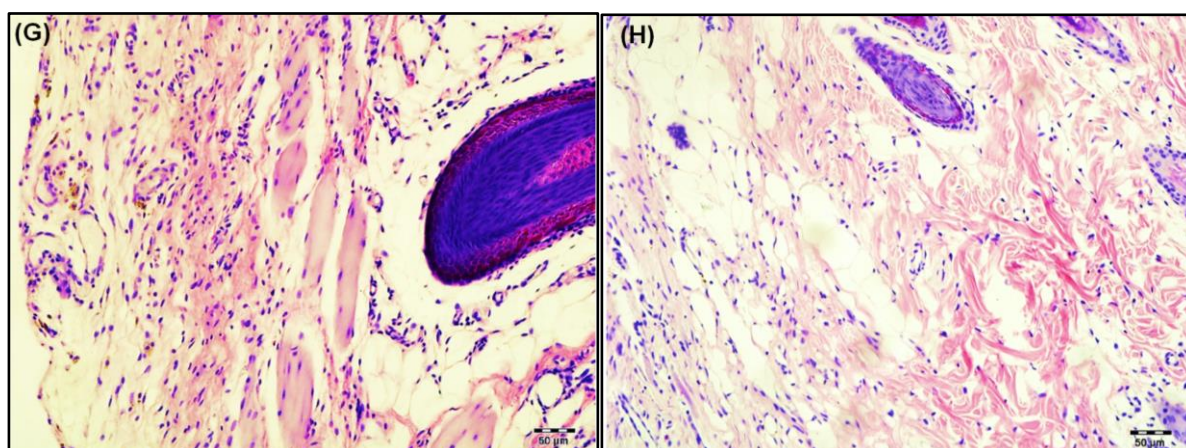
DIA 7

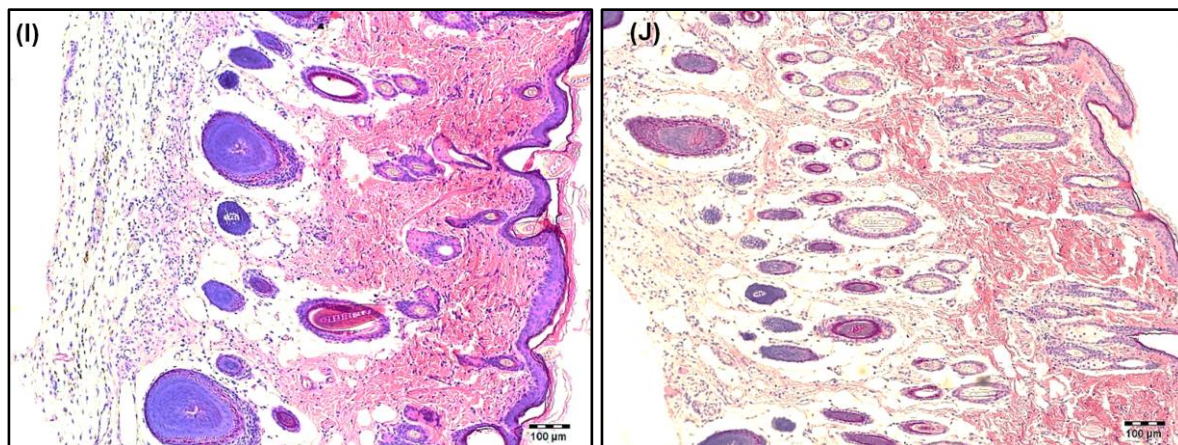


DIA 14



DIA 21



DIA 28

Fonte: A autora.

Coloração: Hematoxilina-eosina (HE). Dias 2, 7, 14 e 21 (aumento 400x) e 28 (aumento 100x).
(□) infiltrado inflamatório, (→) macrófago e (•) vaso sanguíneo.

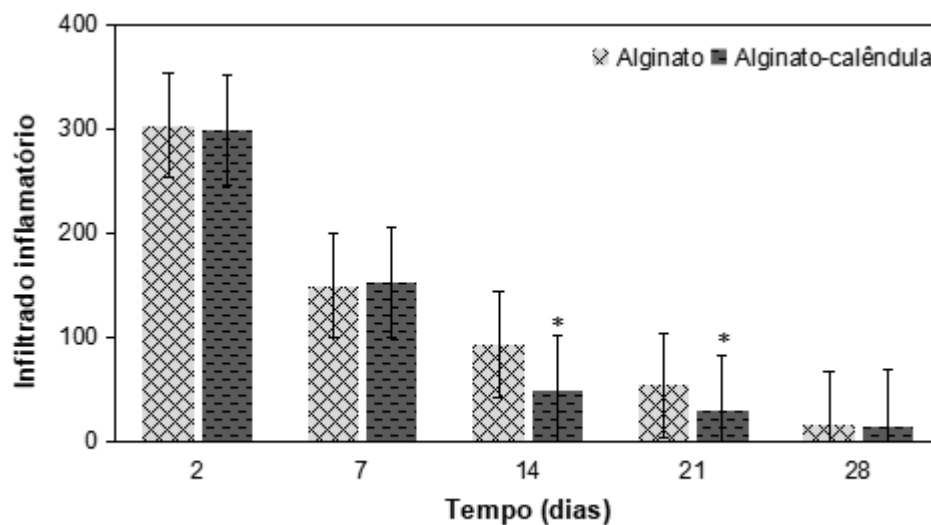
Infiltrado Inflamatório

A resposta inflamatória é uma etapa importante durante o processo de cicatrização ao preparar o leito da lesão para ser reparado. Porém, não pode ser muito pronunciada e nem muito extensa porque prolonga o tempo necessário para a cicatrização, além de causar distúrbios no processo de formação do colágeno (CAMPOS et al, 2008).

A avaliação do processo inflamatório das lesões evidenciou, no 2º dia do pós-cirúrgico, um denso infiltrado inflamatório nos grupos controle e alginato-calêndula, seguido de uma queda progressiva do infiltrado no decorrer do tratamento até o 28º dia.

Na análise quantitativa das células inflamatórias (Figura 21), o grupo tratado com hidrogel de alginato-calêndula apresentou diferença estatística significativa e menor quantidade de infiltrado inflamatório no 14º dia ($p= 0,00$) e 21º dia ($p= 0,00$) quando comparado ao grupo controle.

Figura 21 - Infiltrado inflamatório nos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.

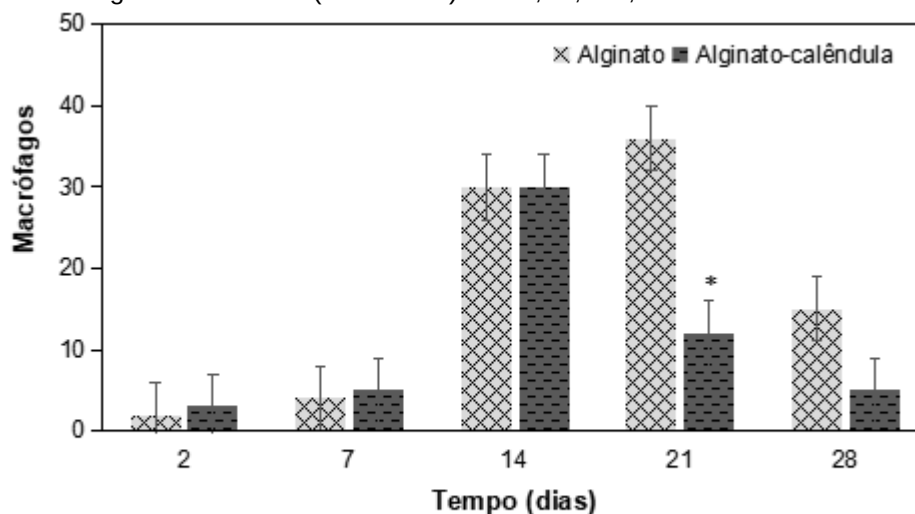


Fonte: A autora.

* $p \leq 0,05$ quando comparado ao controle.

Na análise quantitativa, os macrófagos aparecem em número expressivo no 14º dia nas lesões de ambos os grupos. No entanto, no 21º dia, o grupo tratado com o hidrogel alginato-calêndula teve diminuição significativa ($p = 0,004$) de macrófagos, diferindo significativamente do grupo controle. Os resultados mostram maior número de macrófagos no grupo tratado com hidrogel de alginato ao final do tratamento, fato que pode estar relacionado a uma resposta tardia no processo de cicatrização, quando comparado com o grupo tratado com o hidrogel de alginato-calêndula (Figura 22).

Figura 22 - Macrófagos nos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.



Fonte: A autora.

* $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Na fase inflamatória, ocorre a migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos ao local da lesão. Os neutrófilos são os primeiros a chegar e fazem a limpeza do local da lesão, são atraídos por gradientes quimiotáticos e são importantes para a descontaminação efetiva de feridas. Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, são produzidas para destruir microrganismos patogênicos. Os neutrófilos são substituídos gradativamente pelos macrófagos (CAMPOS et al., 2008).

Os macrófagos desempenham importante papel na cicatrização, englobam restos celulares e produzem citocinas que auxiliam na proliferação celular e restauração do tecido lesado (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* (KHANNA et al., 2010).

Caetano et al. (2014), realizaram seu experimento com ratos submetidos ao processo cirúrgico de indução de lesões, divididos em dois grupos: 1) tratado com soro fisiológico; 2) tratado com alginato-quitosana. De modo semelhante ao obtido no presente trabalho, os resultados evidenciaram um aumento do infiltrado inflamatório nos primeiros dias, seguido de uma queda progressiva com o decorrer do tempo.

Muitas propriedades são atribuídas a calêndula e seus efeitos estão relacionados aos componentes da flor, como sesquiterpenos, álcool, saponinas, triterpenos, flavonóides, hidroxycumarina, carotenóides, taninos e óleos voláteis (NAEINI; SHAFLEI, 2012).

A atividade anti-inflamatória relatada para os extratos das flores de *Calendula officinalis* está relacionada à sua ação cicatrizante, já que em muitos casos o processo inflamatório normal que acompanha a cicatrização e à formação do tecido de granulação pode estar exacerbado (BRASIL, 2014). Uma inflamação temporária é benéfica no início da ferida, enquanto uma fase de inflamação prolongada leva a incidência de feridas crônicas. Os triterpenos das flores de calêndula podem equilibrar o efeito inflamatório e pode ser benéfico em casos de feridas que são acompanhadas por uma inflamação contínua (GURTNER et al., 2008).

Extratos de *Calendula officinalis* L. mostraram propriedades anti-inflamatórias e de cicatrização de feridas, essas propriedades foram associadas a ésteres de ácidos graxos triterpenóides e ésteres de faradiol (EGLSEER et al., 1997). Os triterpenóides são apresentados como principais ativos antiinflamatórios da calêndula. Dentre eles, o monoéster de faradiol parece ser o princípio mais relevante devido à sua prevalência quantitativa (DELLA et al., 1994).

No modelo animal de cicatrização de feridas, emulsões de fase gel lamelar contendo óleo de calêndula mostrou um aumento no recrutamento de leucócitos para a ferida nos dias 2 e 7, mas reduziu o recrutamento de leucócitos após 14 e 21 dias, em comparação com o controle (OKUMA, 2013), de modo semelhante ao obtido no presente trabalho.

A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da calêndula foi atribuída à diminuição da exsudação serosa, da hiperemia, da deposição de fibrina e da hiperplasia epidermal, além de resultar em crostas mais delgadas e umedecidas.

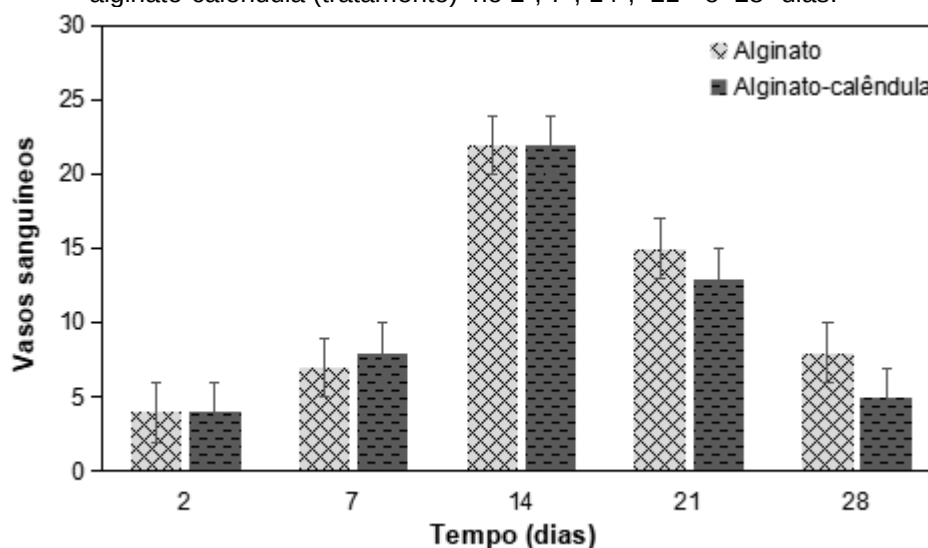
Assim, o extrato etanólico da calêndula atuou de forma positiva sobre a atividade cicatricial em feridas cutâneas de ratos (PARENTE et al., 2012).

Angiogênese

A angiogênese, formação de novos capilares a partir de vasos pré-existent, é indispensável para a cicatrização bem sucedida de feridas. É estimulada pelas células endoteliais e pelos macrófagos (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). Participa da formação do tecido de granulação e fornece oxigênio e nutrientes para o tecido em crescimento.

A avaliação da angiogênese após o tratamento das lesões mostra um aumento no número de vasos sanguíneos no 14º dia, seguido da sua redução no decorrer do tratamento até o 28º dia nos dois grupos: controle e hidrogel alginato-calêndula. Não houve diferença significativa entre os grupos, conforme ilustrado na Figura 23.

Figura 23 - Vasos sanguíneos nos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.



Fonte: A autora

A geração de novos vasos sanguíneos na região da ferida é essencial para o processo de cicatrização. Na doença vascular crônica, o suprimento de oxigênio é reduzido e a atividade angiogênica é insuficiente para promover a expansão de

novos vasos sanguíneos no local da ferida, restringindo a entrada de células inflamatórias, nutrientes e oxigênio (BUZZI et al., 2016).

Dentre as propriedades da *Calendula officinalis* está a ativação da angiogênese no tecido lesado. Um estudo usando extrato de calêndula demonstrou atividade angiogênica aumentadas em membranas corioalantóicas de frango e feridas cutâneas em ratos (BUZZI et al., 2016).

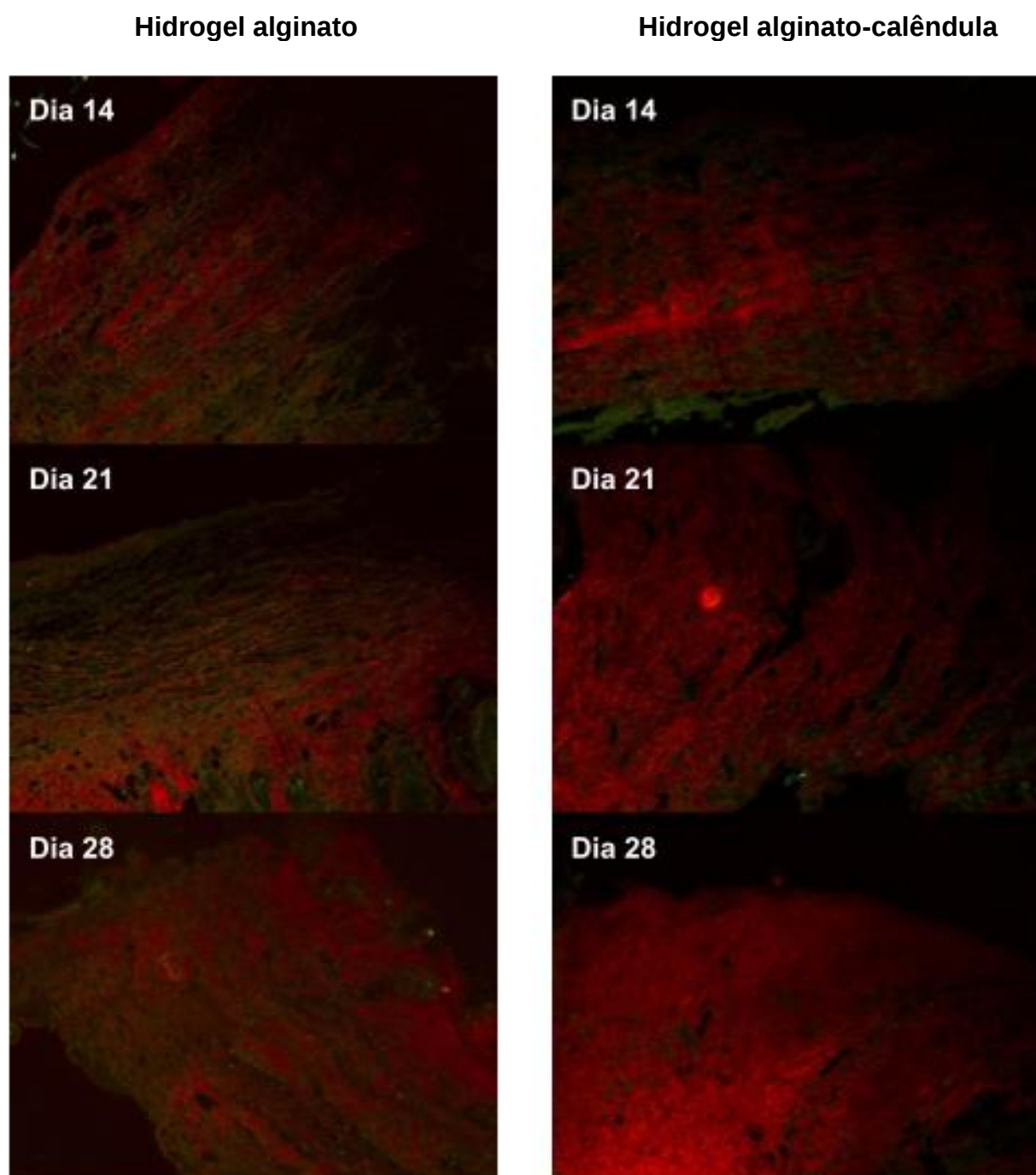
Entretanto, no presente estudo a adição de extrato de calêndula não resultou em estímulo à angiogênese superior ao do hidrogel de alginato (controle). Fato que pode ser atribuído ao hidrogel de alginato também favorecer condições ideais para o processo de cicatrização, como o meio úmido. Curativos de alginato são encontrados no mercado e comumente utilizados no tratamento de feridas cutâneas.

Fibras colágenas

O colágeno é a principal proteína da matriz extracelular e a mais abundante no tecido conjuntivo durante o processo de cicatrização. Há várias formas de fibras colágenas, com diferentes estruturas químicas e funções biológicas. O colágeno tipo III, constituído de fibras finas, é considerado uma matriz temporária durante a remodelação do tecido e um constituinte essencial na formação do tecido de granulação. O colágeno tipo I representa 90% do total no organismo e sua principal função é proporcionar resistência à tensão, graças à espessura das fibras (MINAMOTO, 2007).

No presente trabalho, foi possível observar fibras avermelhadas, grossas e uniformes, características do colágeno tipo I em quantidade superior no grupo tratado com o hidrogel alginato-calêndula. No grupo controle, há o predomínio de fibras verdes, finas e desorganizadas características do colágeno tipo III. As imagens ilustrativas estão apresentadas na Figura 24.

Figura 24 - Aspectos das fibras de colágeno tipo I e tipo III dos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14, 21 e 28



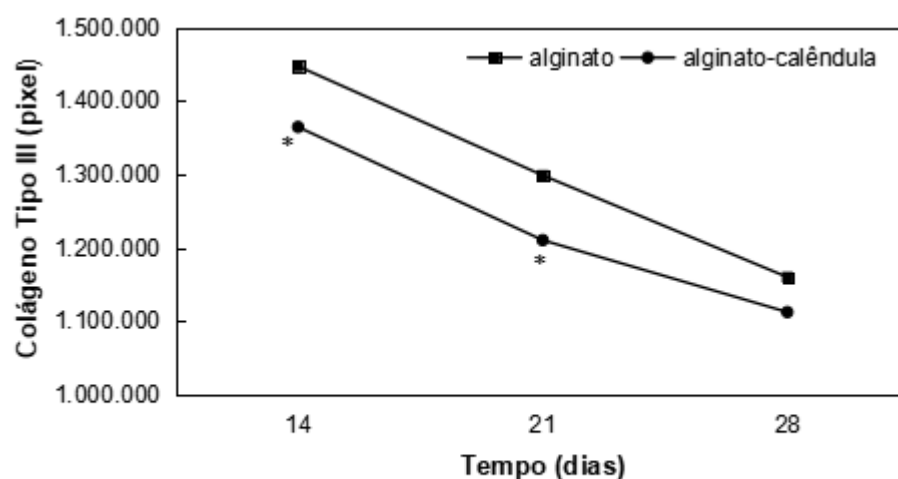
Fonte: A autora.

Coloração: Picrosirius red (aumento 100X). Colágeno tipo III (verde) e fibras tipo I (vermelhas)

Durante a fase de maturação da cicatrização de feridas, as fibras colágenas remodelam-se e mudam de orientação com aumento das ligações cruzadas e consequente aumento da resistência. As fibras finas tipo III, de natureza transitória, diminuem gradualmente enquanto as do tipo I, mais espessas, aumentam. As metaloproteinases de colágeno, liberadas pelos fibroblastos e macrófagos, degradam o colágeno tipo III do tecido de granulação e o substituem por colágeno tipo I, que é posteriormente reorganizado em fibrilas paralelas, formando uma cicatriz de baixa celularidade (EL SHERIF et al., 2006).

Os resultados da análise das fibras de colágenos estão apresentados nas Figuras 25 e 26.

Figura 25 - Fibras colágenas Tipo III nas lesões dos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14, 21 e 28.



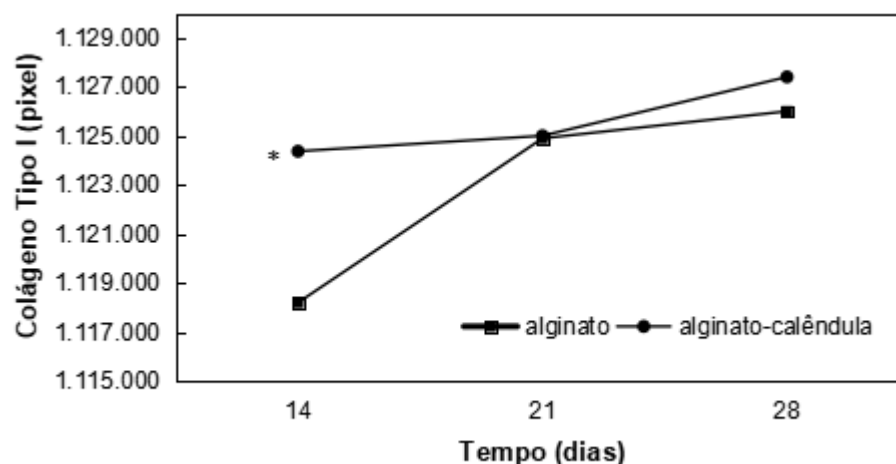
Fonte: A autora.

* $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Observa-se uma diminuição progressiva de fibras colágenas Tipo III em ambos os grupos. Comparado ao grupo controle, o grupo tratado com hidrogel de alginato-calêndula apresentou um número significativamente menor de fibras de colágeno do Tipo III no 14º ($p = 0,03$) e 21º dias ($p = 0,01$).

Na análise quantitativa de fibras colágenas Tipo I, observa-se um progressivo aumento em ambos os grupos. Entretanto, o grupo tratado com hidrogel de alginato-calêndula apresentou um número significativamente maior de fibras de colágeno do Tipo I no 14º ($p = 0,00$) comparado ao grupo controle.

Figura 26 - Fibras colágenas Tipo I nas lesões dos grupos tratados com hidrogel de alginato (controle) e hidrogel de alginato-calêndula (tratamento) nos dias 14, 21 e 28.



Fonte: A autora.

* $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Resultados semelhantes foram descritos em um estudo sobre o efeito de diferentes concentrações de gel de *Calendula officinalis* sobre a produção de colágeno na cicatrização. No experimento, 65 ratos foram divididos em três grupos: controle, placebo e grupo de tratamento. A produção de colágeno no grupo tratado com gel a 7% foi significativamente maior do que nos grupos placebo e controle. A aplicação tópica do gel *Calendula officinalis* no 14º dia foi mais eficiente do que nos demais dias, evidenciando significativa atividade sobre a síntese de colágeno (NAEINI; SHAFLEI, 2012).

O efeito do extrato da flor de *Calendula officinalis* foi investigado em queimaduras induzidas em ratos. As queimaduras na região dorsal dos animais foram tratadas com diferentes doses do extrato das flores. Os animais que receberam a aplicação do extrato apresentaram melhora significativa na cicatrização quando comparados com os do grupo controle (não tratados). Entre os indicadores da cicatrização, o conteúdo de colágeno aumentou significativamente no grupo tratado, indicando a contribuição do extrato de calêndula no processo cicatricial (CHANDRAN; RAMADASAN, 2008).

Portanto, ficou demonstrado que a adição de extrato de calêndula ao hidrogel de alginato favoreceu a síntese de colágeno Tipo I e, conseqüentemente, contribuiu para a cicatrização.

6. CONCLUSÃO

Os ensaios de caracterização físico-química e organoléptica e o teste de estabilidade preliminar evidenciaram que o hidrogéis de alginato possuem características adequadas para a aplicação em feridas cutâneas e mantêm-se estáveis com a adição do extrato de calêndula, principalmente sob-refrigeração e na temperatura ambiente. Os ensaios de estabilidade acelerada deverão ser realizados para determinar o prazo de validade do produto.

O ensaio *in vivo* mostrou que a adição do extrato de calêndula ao hidrogel potencializa o efeito cicatrizante do alginato através das seguintes evidências: menor tempo para o fechamento das lesões, menor quantidade de infiltrado inflamatório (neutrófilos e macrófagos) e estímulo da síntese de colágeno. Portanto, o hidrogel de alginato-calêndula apresenta potencial para o emprego no tratamento de feridas cutâneas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. M.; RENAUD, B. G.; OLIVEIRA, B. Atendimento a pacientes com feridas crônicas nas salas de curativos das policlínicas de saúde. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 152, p. 42-49, 2013.
- AKHTAR, N.; KHAN, B.A.; MAHMOOD, T.; PARVEEN, R.; QAYUM, M.; ANWAR, M.; ZAMAN, S.U.; FAROOQ, M. Formulation and evaluation of anti sebum secretion effects of sea buckthorn w/o emulsion. **Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 2, p.13-17, 2010.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H. KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 42, p.1255-1260, 1996.
- AOYAGI, S.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Novel chitosan wound dressings loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 330, p.138–145, 2007.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª Edição, Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.
- BABAEI, N.; MOSLEMI, D.; KHALILPOUR, M., VEJDANI, F.; MOGHADAMNIA, Y.; BIJANI, A.; BARADARAN, M.; KAZEMI, M. T.; KHALILPOUR, A.; POURAMIR, M.; MOGHADAMNIA, A. A. Antioxidant capacity of Calendula officinalis flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p.18-22, 2013.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27-51, 2005.
- BARA, M.T.F; CIRILO, H.; OLIVEIRA, V. Determinação de ginkgo flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias primas e produtos acabados. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.1, p.1-7, 2004.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, p. 285-292, 2004.
- BERGO, A. M. A. et al. **Protocolo de prevenção e tratamento de feridas**. Prefeitura de São Paulo: Comissão de prevenção e tratamento de feridas COGESP, 1ª Edição, São Paulo, 2011.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. 6ª Edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1ª Edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **(Monografia da espécie *Calendula officinalis* L.)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas** / Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

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

BUENO, C. Z. **Influência do tipo de estratégia de reforço de propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o reconhecimento de lesões de pele**.114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

BUZZI, M.; FREITAS. F.; BARROS WINTER. M. Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. **Journal Wound Care**. 2016.

CAETANO, G.F. et al., Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal Biomedical Materials**, 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. 281-188, 2008.

CARVALHO-FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 24-30, 2006.

CHAKRABORTY GS. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Calendula officinalis* (Linn.). **Journal Herbal Medicine Toxicology**, p. 65-66, 2008.

CHANDRAN, P.K., KUTTAN, R.. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal Burns. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, p. 58–64, 2008.

COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 37, p. 45-51, 2010.

CORDOVA, C.A.; SIQUEIRA, J.R.; NETTO, C.A.; YUNES, R.A.; VOLPATO, A.M.; CECHINEL FILHO, V.; CURI-PEDROSA, R.; TB CRECZYNSKI PASA, T.B. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. **Redox Report**. v. 7, p. 95-102, 2002.

CRUZ, C. H.G.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**. v.31, São Paulo, 2008.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele**. 212 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

DAREZZO, A. **Importância do ph nas formulações**, 2017. Disponível em: <https://www.quimicadabeleza.com/a-importancia-do-ph-nas-formulacoes/>. Acesso em: 13 set. 2020.

DELLA L.R; TUBARO A. S.;, BECKER, H.; ISAAC, O. O papel dos triterpenóides na atividade antiinflamatória tópica de flores de *Calendula officinalis* . **Planta Medica**. v. 60, p. 516-520, 1994.

DERNOWSEK, J. **Pele**, 2020. Disponível em: <https://www.bioedtech.online/post/pele> Acesso em: 01 jan. 2021.

DIAS, T. M. Z. S. Reparo tecidual. In: ROCHA, A. **Patologia**. 2ª Edição. – São Paulo: Editora Rideel, 2011.

DORANTES, L. C; AYALA, M.C. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. **International Journal of Inflammation**, 2019

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, 2006.

EGLSEER, S; et al. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) **Journal Ethnopharmacol**, 1997.

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

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Gene therapy and wound healing **Clinics in Dermatology**, p. 79-92, 2007.

ENOCH, S; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**. v.26, 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. **Nature Online**, v.7, p. 56-60, 2009.

FARIA, R.L., CARDOSO, L.M., AKISUE, G., PEREIRA, C.A., JUNQUEIRA, J.C., JORGE, A.O., SANTOS JÚNIOR, P.V. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars. **Journal of Applied Oral Science**, p. 476–482, 2011.

FERREIRA, S.; OLIVEIRA; FONSECA; FERREIRA C.I.M.; MORENZ, F.J.; Desempenho de cabritos tratados com calêndula e associações. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, 2013.

FONTES, G. G. **Efeito de formulação fitoterápica contendo *Calendula officinalis* no metabolismo lipídico em ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 2015.

FRANÇA, L. A. F.; CARDOSO, J. C.; LIMA, C. M. **Desenvolvimento de sabonete cremoso para controle do pH vaginal**. Cadernos de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde. Aracaju, v. 13, n. 14, 2011.

FRYKBERG, R., BANKS, J. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Advances in Wound Care**, p.560–582, 2015.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 226-235, 2007.

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.

GEOVANINI, T.; JUNIOR, A. G. O. **Manual de curativos**. 2ª Edição Corpus: São Paulo, 2008.

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

GONÇALVES, G. M; BRIANEZI, G.; MIOT, H.A. The pH of the main Brazilian commercial moisturizers and liquid soaps: considerations on the repair of the skin barrier. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, p.736-738, 2017.

GRIMME, H.; AUGUSTIN, M. Phytotherapy in chronic dermatoses and wounds: what is the evidence? **Forsch. Komplementmed**. v. 6, p. 5–8, 1999.

GUO; L.A. DIPIETRO. Factor affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, p. 219-229, 2010.

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

HAMBURGER, S. et al. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoter**, v. 74, p. 328- 338, 2003.

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

HENESS G.; BEN-NISSAN, B. Innovative bioceramics, Materials Forum. **Institute of Materials Engineering Australasia**, 2004.

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

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

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

JANIS, J.E.; HARRISON, B. Wound healing: Part I. basic science. **Plastic and Reconstructive surgery**. v. 133, p. 199-2017, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO. **Journal Basic Histology**. 14^a Edição, New York. MCGraw-Hill, 2016.

KARRI, V.V.S.R.; KUPPUSAMY, G.; TALLURI, S.V.; MANNEMALA, S.S.; KOLLIPARA, R.; WADHWANI, A.D.; MULUKUTLA, S.; RAJU, K.R.S.; MALAYANDI, R. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, p.1519-1529, 2016.

KAWAHARA, F. A. **Avaliação do efeito cicatrizante de filmes de alginato contendo gel de babosa em queimaduras cutâneas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2018.

KHALID, A. K.; TEIXEIRA DA SILVA J. A. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. **Scientia Horticulturae**.p. 297-305. 2010.

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

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

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

KOGA, A. Y.; PEREIRA, A. V.; LIPINKI, L. C.; OLIVEIRA, M. R. Evaluation of wound healing effect of alginate films containing Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. **Journal of Biomaterials Applications**, p.1212-1221. 2018.

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.

KÜHNEL, W. et al. **Histologia: texto e atlas**. 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

MARTINEZ - FLORES, S. et al. Los flavonoides; propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria** v.17, p.271-278, 2002.

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

MEDEIROS. A. C.; DANTAS FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical Research**, v. 7, p. 87-102, 2016.

MEIRELES, I. B.; SILVA, R. C. L. Fundamentos biológicos para o atendimento ao portador de lesão de pele. 2ª Edição. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul: Yendis, 2008.

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

MENEGUSSI, L. R. et al. Behaviour of Pseudoisocyanine in Macromolecular and Hydrotropic Solutions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1455-1461, 2014.

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

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

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

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

NAEINI, M. R., SHAFIEI, N. et al. Efeitos da aplicação tópica do gel de *Calendula officinalis* no conteúdo de colágeno e hidroxiprolina da pele de ratos. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, p. 253-257, 2012.

NERY, J.C. **Obtenção e caracterização de filmes de alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Centro Federal de Educação Tecnológica em Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NESIC, A.R.; SESLIJA, S.I. The influence of nanofillers on physical–chemical properties of polysaccharide-based film intended for food packaging. **Food Packaging**, p.637-697, 2017.

OKUMA, C.H. **Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos**. (Doutorado). Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

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

PARENTE, L.M.: LINO JÚNIOR, R.S; TRESVENZOL, L.M., VINAUD, M.C; PAULA, J.R.: PAULO, N.M. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2012

PARENTE, L.M.L.; SILVA M.S.B.; BRITO L.A.B.; LINO JÚNIOR, R.S; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; ZATTA, D.T.; PAULO, N.M. Efeito Cicatrizante e Atividade Antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, 2009.

PATRO. Imagem de *Calendula officinalis* L, 2013.

PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitosan and alginate based hydrogel films for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.52, p.221-230, 2004.

PETZ, F. F. C. **Terapia a laser na cicatrização da úlcera por pressão em adultos e idosos: revisão sistemática**. 2015, 140 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

POMMIER, P., GOMEZ, F., SUNYACH, M.P., D'HOMBRES, A., CARRIE, C., MONTBARBON, X.. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, p.1447–1453, 2004.

PREETHI, K. C; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. **Indian Journal Experimental Biology**. v. 47, p.113-120, 2009.

PREETHI, K.C., KUTTAN, R., 2009. Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. v. 20, p. 73–79, 2009.

PREETHI, K.C., SIVEEN, K.S., KUTTAN, R., KUTTAN, G. Inhibition of metastasis of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L.flowers. Asian Pac. **European Journal of Cancer Prevention**. v. 11, p. 1773–1779, 2010.

RAKHORST, G; PLOEG R. Biomaterials in Modern Medicine: The Groningen Perspective. **World Scientific Publishing Company**, 2008.

RAMOS, A.P.; PIMENTEL, LC. Ação da babosa no reparo tecidual e cicatrização. **Brazilian Journal of Health**. v.2, p. 40-48, 2011

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J.E. Biomaterials science, an introduction to materials in medicine. San Diego, Estados Unidos: **Academic Press**, 1996.

RODRIGUES, A.P. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões**. 2008. 90f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, 2008.

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

SANTOS, F. V. et al. **Manual de Curativos**: Prefeitura Municipal de Campinas, 2016.

SCHULTZ, ET AL. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair Regen.** v.19, p.134–148, 2011.

SILVA, E. S. **Feridas crônicas: conhecimento e importância do tratamento sob a ótica do paciente**. 2011, 63 f. Monografia (Especialização em Saúde Pública) – Programa de Pós-Graduação em Saúde, Faculdade Adventista da Bahia, Cachoeira, 2011.

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

SKOULA, M.; ABBES, J.E.; JOHNSON, C.B. Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia suffruticosa* Mill. growing in Crete. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 28, p. 551–561, 2000.

SMANIOTTO, P. H. S.; FERREIRA, M. C.; ISAAC, C.; GALLI, R. Sistematização de curativos para o tratamento das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. São Paulo, 2012.

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

SZAKIEL, A., RUSZKOWSKI, D., GRUDNIAK, A., KUREK, A., WOLSKA, K.I., DOLIGALSKI, M., JANISZOWSKA, W. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). **Planta Medica**. v. 74, p. 1709–1715, 2008.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 3, p. 259-264, 2008.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. (Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. **Journal Natural Products**. v. 69, p.1692-1696, 2006.

UNSONST, E. **ph da pele**, 2016. Disponível em: set. <https://rc24h.com.br/noticia/ver/20162/colunista-rc24h---edviges-unsonst--ph-da-pele>. Acesso em:10/set./2020.

VELLOSO, M. A. L.; ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo in vitro. **Acta Amazônica**, 2009.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. :835-70, 2003.

ZAHEDI, P. et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. **Polymers Advanced Technologies**, v. 21, p. 77-95, 2010.