



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E MORFOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ALEXSANDRA FRAZAO DE ANDRADE

Atividade cicatrizante *in vitro* e caracterização proteica e físico-química de um gel à base de extrato aquoso de *Chlorella vulgaris*

Recife, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E MORFOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

ALEXSANDRA FRAZAO DE ANDRADE

Atividade cicatrizante *in vitro* e caracterização proteica e físico-química de um gel à base de extrato aquoso de *Chlorella vulgaris*

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Raquel Pedrosa Bezerra

Coorientadoras:

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva

Recife, 2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Alexsandra Frazão de Andrade

Título: Atividade cicatrizante *in vitro* e caracterização proteica e físico-química de um gel à base de extrato aquoso de *Chlorella vulgaris*

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal, área de concentração em Biotecnologia.

_____ em 18 de fevereiro 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra

**Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de
Pernambuco
(Presidente)**

Prof^a. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques

**Universidade de Pernambuco
(1º Examinador)**

Prof^a. Dra. Elayne Karine Souto de Melo

**Centro Universitário Maurício de Nassau
(2º Examinador)**

Agradecimentos

A Deus por me abençoar com vida e por ter me permitido chegar até aqui.

A minha mãe por ser esse exemplo de vida, não sei o que seria de mim sem ela. Agradeço muito a minha família, em especial a minha tia Raquel por sempre estar presente da maneira possível.

A minha orientadora, Profa. Raquel Pedrosa, por compartilhar o amor pelas microalgas, pela paciência e amizade. Proporcionou o meu crescimento acadêmico e concedeu a oportunidade de realizar essa pesquisa científica. É um exemplo de dedicação e profissionalismo. Serei eternamente grata.

Agradeço as minhas coorientadoras Profa. Ana Lúcia e Profa. Rosali Maria pelas contribuições nesse projeto.

As minhas alunas de iniciação científica, Micaleyde Egito e Millena Patrício, pela convivência, contribuição e disposição, vocês foram essenciais nessa etapa.

Aos meus amigos do Cenapesq/Labtecbio, Aldeni, Priscilla, Páblo, Ariadne, Vivianne, Karoline, Andreza, Yanara, Leonardo, José, Emanuelle, pela força e carinho. Vocês são maravilhosos. Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha eterna companheira de laboratório, Rebeca Melo, pela amizade, carinho e por tudo que foi compartilhado.

Aos queridos amigos que fiz durante o percurso. Profa. Cristiane Araújo que sempre ajudou e torceu por mim. Ao meu amigo Pedro Renaud que sempre escutou os meus desesperos. Meu eterno carinho e gratidão.

A equipe da UFPE no laboratório LTM, especialmente Williana pela ajuda no desenvolvimento na formulação.

Aos diversos laboratórios que passei, agradeço.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade Federal de Pernambuco, aos professores dessas universidades, pelo conhecimento e bons momentos.

Ao programa de pós-graduação Biociência Animal, coordenadora Profa. Tatiana Porto e Prof. Rinaldo, pela disponibilidade e boa convivência.

A todos que participaram, incentivando e torcendo, da minha vida e do desenvolvimento deste trabalho nestes dois anos.

A FACEPE, pela bolsa de mestrado, sem ela seria muito difícil.

Resumo

A microalga *Chlorella vulgaris* apresenta em sua biomassa diferentes metabólitos, tais como, lipídios, polissacarídeos, enzimas, proteínas, que auxiliam na produção de agentes cicatrizantes. Um único tratamento não preenche os requisitos para ser aplicado a todos os tipos de lesões cutâneas, tendo em vista que um produto deve ser selecionado com base na profundidade, extensão, localização e origem da lesão. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização do extrato de *C. vulgaris* e da formulação para a atividade cicatrizante. Inicialmente a microalga foi cultivada em meio padrão suplementado com 1% de milhocina. A biomassa seca foi ressuspensa em tampão na concentração de 50 mg/mL, sonicada e centrifugada para caracterização do sobrenadante, denominado de extrato celular. A caracterização foi realizada pela análise qualitativa de fitoquímicos por ensaio colorimétrico e para o doseamento de fenóis totais foi realizado espectroscopia e expresso por ácido gálico (AG). As proteínas presentes no extrato foram precipitadas com sulfato de amônio, purificadas por cromatografia de troca iônica e o perfil eletroforético analisado por gel SDS-PAGE. Foi realizada atividade hemaglutinante das frações proteicas obtidas utilizando eritrócitos bovinos, equinos e do sistema sanguíneo humano ABO (tipo A, B e O). A citotoxicidade *in vitro* do extrato celular foi testada em diferentes concentrações em fibroblastos primários. A caracterização da formulação foi realizada através de estudo organoléptico, avaliação do pH, espalhabilidade e viscosidade. Os excipientes da formulação foram submetidos à espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) para análise da estrutura das moléculas, e ao analisador termogravimétrico (TGA) para análise da estabilidade térmica. No extrato foi detectado a presença de terpenos e conteúdo de fenóis totais de $1,35 \pm 0,18$ mg/g de AG. Na etapa de purificação foram obtidos dois picos, o primeiro eluído a 0,15 M de NaCl e o segundo pico eluído a 1,0 M. Apenas o primeiro pico demonstrou teor proteico de 250 µg/mL, atividade hemaglutinante de $\geq 2^5$ para tipo B e uma única banda com aproximadamente 36 kDa. O extrato apresentou citocompatibilidade, não induzindo efeito citotóxico nas células durante o período de 48h. A formulação apresentou cor esverdeada, textura suave, ligeiramente turva, odor característico do extrato da microalga e pH na faixa de $7,09 \pm 0,07$. Os resultados do teste de espalhabilidade e viscosidade indicam que a formulação pode facilmente fluir e se espalhar na área aplicada. A partir do FT-IR foi possível

observar a presença de amina, carboidratos e terpenos. De acordo com a curva TGA, o percentual de perda de massa final do extrato celular foi de 23,56%, ocorrendo a 218,64 °C. carbopol teve perda de massa de 19,39%, ocorrida a 301,62%. A perda de massa da metilisotiazolinona foi de 94,69%; a curva mostra que a qualidade diminuiu rapidamente até 152,2 °C, principalmente por evaporação da água. A eficácia terapêutica das formulações tópicas é influenciada por fitoconstituintes ativos e características veiculares que desempenham um papel importante no controle da permeabilidade do medicamento. As biomoléculas ativas provenientes destes microrganismos fotossintéticos tornam-se uma alternativa potencial para o tratamento de doenças, apresentando alta disponibilidade e baixa toxicidade.

Palavras-chave: Microalga, Compostos bioativos, Caracterização físico-química, Estabilidade do gel, Lesões.

Abstract

The microalgae *Chlorella vulgaris* presents in its biomass different metabolites such as lipids, polysaccharides, enzymes, proteins, which help in the production of healing agents. A single treatment does not meet the requirements to be applied to all types of skin lesions, since a product must be selected based on the depth, extent, location and origin of the lesion. Therefore, the objective of this work was to perform the characterization of *C. vulgaris* extract and the formulation for healing activity. Initially, the microalgae was cultivated in standard Bold's Basal medium supplemented with 1% corn steep liquor. The dried biomass was resuspended in a concentration of 50 mg/mL buffer, sonic and centrifuged for characterization of the supernatant, called cell extract. The characterization was performed by qualitative analysis of phytochemicals by colorimetric test and for the dosage of total phenols, spectroscopy was performed and expressed by gallic acid (AG). The proteins present in the extract were precipitated with ammonium sulfate, purified by ion exchange chromatography and the electrophoretic profile analyzed by SDS-PAGE gel. Hemagglutinating activity of the protein fractions obtained using bovine, equine and human ABO (type A, B and O) red blood cells was performed. The in vitro cytotoxicity of the cell extract was tested in different concentrations in primary fibroblasts. The characterization of the formulation was performed through organoleptic study, evaluation of pH, spreadability and viscosity. The excipients of the formulation were submitted to Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for analysis of the structure of the molecules, and to a thermogravimetric analyzer (TGA) for thermal stability analysis. Terpenes and total phenol content of 1.35 ± 0.18 mg/g AG were detected in the extract. In the purification step two peaks were obtained, the first eluate at 0.15 M of NaCl and the second at 1.0 M. Only the first peak showed protein content of 250 μ g/mL, hemagglutinating activity of ≥ 25 for type B and a single band with approximately 36 kDa. The extract showed cytocompatibility, not inducing cytotoxic effect in the cells during the 48h period. The formulation had a greenish color, smooth texture, slightly cloudy, characteristic odor of the microalgae extract and pH in the range of 7.09 ± 0.07 . The results of the spreadability and viscosity test indicate that the formulation can easily flow and spread over the applied area. From the FT-IR it was possible to observe the presence of amine, carbohydrates and terpenes. According to the TGA curve, the percentage of final cell extract mass loss was 23.56%, occurring at 218.64 °C.

carbopol had a mass loss of 19.39%, occurring at 301.62%. The loss in mass of methylisothiazolinone was 94.69%; the curve shows that the quality decreased rapidly to 152.2 °C, mainly by evaporation of water. The therapeutic efficacy of topical formulations is influenced by active phytoconstituents and vehicular characteristics that play an important role in the control of the drug permeability. The active biomolecules from these photosynthetic microorganisms become a potential alternative for the treatment of diseases, presenting high availability and low toxicity.

Keywords: Microalgae, Chemical constituents, Physical-chemical characterization, Gel stability, Lesions.

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1 Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> : cultivo, constituintes químicos e atividades biológicas.	17
2.1.1 Cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i>	18
2.1.2 Constituintes químicos da <i>Chlorella vulgaris</i>	19
2.1.3 Atividades biológicas da <i>Chlorella vulgaris</i>	20
2.2 A pele e o processo de cicatrização	21
2.2.1 Produtos cicatrizantes	24
2.3 A importância das caracterizações físico-químicas e reológicas das formulações	26
2.4 Teste de estabilidade das formulações	27
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo geral:	29
3.2 Objetivos específicos:	29
5. Referências	30
6. Capítulo 1 – Artigo 1	36
1. Introduction	40
2. Materials and methods	41
2.1. Microorganism and culture conditions	41
2.2 Preparation of the extract	41
2.4 Phytochemical characterization	42
2.4.1 Phytochemical screening	42
2.4.2 Determination of total phenolic content	42
2.5 Proteins characterization	42
2.5.1 Protein Purification	42

2.5.2 Protein concentration	42
2.5.3 Analysis of the extract in electrophoresis	42
2.5.4 Hemagglutinating activity	43
2.6 Cytotoxicity Assay	43
2.7 Preparation of gel formulation	43
2.8 Gel characterization	44
2.8.1 Organoleptic evaluation	44
2.8.2 pH measurement	44
2.8.3 Viscosity:	44
2.8.4 Spreadability determination	44
2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	45
2.10 Thermogravimetric Analysis (TGA)	45
3. Results and Discussion	45
3.1 Phytochemical characterization	45
3.2 Protein Characterization	45
3.3 Cytotoxicity Assay	48
3.4 Gel characteristics	49
3.5 FTIR spectroscopy	52
3.6 Thermogravimetric Analysis	54
4. Conclusions	55
Acknowledgment	55
Conflict of interest	55
References	55
7. Considerações Finais	60
10. Anexos	61

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	18
Figura 2. A estrutura da pele humana.	21
Figura 3. Etapas do processo de cicatrização.	23

Capítulo 1 – Artigo 1

Figure 1. Chromatographic profile of <i>Chlorella vulgaris</i> extract applied HiTrap™ DEAE FF column; PI eluted with Tris-HCl pH 7.5 with 0.15 M NaCl; PII eluted with Tris-HCl pH 7.5 with 1 M NaCl.	47
Figure 2. SDS-PAGE analysis of the fractions of purified proteins from <i>Chlorella vulgaris</i> extract using DEAE ion-exchange chromatography column. M: Molecular weight marker; 1: Purified 0.15 M NaCl; 2: Purified 1.0 M NaCl.	47
Figure 3. Percentage cell viability of various concentrations of <i>Chlorella vulgaris</i> microalgae extract and the control group (DMEN) on fibroblast cells. Each value represents the mean and SD of 3 experiments.	48
Figure 4. Determination of the spreadability of the gel formulation.	50
Figure 5. Effect of shear rate on the viscosity of formulation gel.	51
Figure 6. Fourier transform infrared spectrum: A – Extract of <i>Chlorella vulgaris</i> , B – Carbopol-940, C – Formulation.	53
Figure 7. TGA of extract, methylisothiazolinone and carbopol-940.	54

Lista de Abreviações e Siglas

μL - microlitro

μG - micrograma

μm – micrometro

a.C. – Antes de Cristo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DMEM - dulbecco's modified eagle's medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

ELISA - ensaio imunoenzimático

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

g - Grama

HCl - ácido clorídrico

IFN-γ - interferon -γ

kD - kilo daltons

L – litro

M - Molar

MEC - matriz extracelular

min - minuto

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

TNF-α – Fator de necrose tumoral

UTEX – Universidade do Texas

1. Introdução

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes exploradas devido ao seu potencial em diversas aplicações comerciais, como na saúde humana e animal, na produção de energia (biocombustíveis), no tratamento de efluentes e na obtenção de compostos de interesse na indústria alimentar, química e farmacêutica (GAUTAM et al., 2013; HTET et al., 2018; MATA et al., 2010).

Esses microrganismos possuem a capacidade de modular o seu metabolismo de acordo com as alterações ambientais, apresentando a capacidade de sintetizar, metabolizar, acumular e secretar uma grande diversidade de metabolitos primários e secundários, com potenciais aplicações de interesse biotecnológico (JABEEN et al., 2019). Apresentam em sua biomassa compostos, tais como, pigmentos, lipídios, polissacarídeos, enzimas e outros metabólitos biologicamente ativos, os tornando uma fonte biológica promissora de novos compostos bioativos (MAGRO et al., 2013; YADAVALLI et al., 2018).

Uma espécie de importância econômica entre as microalgas é *Chlorella vulgaris* devido a sua propriedade de produzir diferentes bioativos, reconhecidos por desempenharem papéis fisiológicos nos organismos (ALBAAYIT et al., 2015; KORDJAZI et al., 2013; NASCIMENTO-NETO et al., 2012). Estudos realizados com o gênero *Chlorella* demonstram potenciais bacteriostáticos, bactericidas, antioxidantes, antifúngica, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória e cicatrizante (MELO et al., 2019; SAEIDNIA et al., 2009; UMA et al., 2011; YADAVALLI et al., 2018).

A cicatrização é um grande desafio para a saúde pública, uma vez que os custos públicos estão crescendo devido ao envelhecimento da população e ao aumento acentuado na incidência de doenças, como diabetes e obesidade, as quais contribuem significativamente para a má cicatrização de feridas (LI et al., 2015). Segundo o World Care Market (2017), o mercado de tratamento de feridas deve atingir US \$ 22,81 bilhões em 2022, em comparação ao ano de 2018 de US \$ 18,99 bilhões. Os fatores que impulsionam esse aumento incluem o aumento na expectativa de vida, o qual é acompanhado pelo aumento do risco de doenças e incidência de feridas agudas e crônicas, as quais requerem atenção clínica, e ao aumento do número de acidentes de trânsito.

A disponibilidade de curativos eficientes ainda é limitada, e apesar dos grandes avanços na área, fazem-se necessárias pesquisas para minimizar os custos e aperfeiçoar os recursos já existentes, principalmente, no contexto da aceleração e na melhora do processo de reparação, bem como proporcionar facilidade de utilização, menor risco de lesão tissular e atividade antiflogística (SILVA et al., 2008). As substâncias existentes no extrato de microalgas podem contribuir com atividades biológicas, podendo ser tão eficientes quantas aquelas produzidas por síntese química, entretanto para a transformação desses compostos em um medicamento deve ser assegurada a integridade química e farmacológica desses, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização (TOLEDO et al., 2003), que devem ser empregadas em cada fase da idealização, avaliação e obtenção do medicamento (SILVA-JUNIOR E PEREIRA, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que facilitem a cicatrização de feridas representa uma grande valia na área biomédica e clínica. As biomoléculas presentes em microrganismos fotossintetizantes podem ser uma potencial fonte na produção de agentes cicatrizantes, em que se torna necessário conhecer as moléculas responsáveis por essa ação cicatrizante, e definir os possíveis fitofármacos que justificam seu grande potencial farmacêutico e biotecnológico. Ainda há um crescente interesse em estudar e entender como os produtos naturais podem contribuir para este processo, com o objetivo de melhorar estas características ou complementar as já existentes, tornando-os acessíveis ao maior número de pessoas, mediante o desenvolvimento de tecnologias mais simples e baratas, igualmente eficientes e que se aproveitem de diversos tipos de matérias-primas.

2. Revisão Bibliográfica

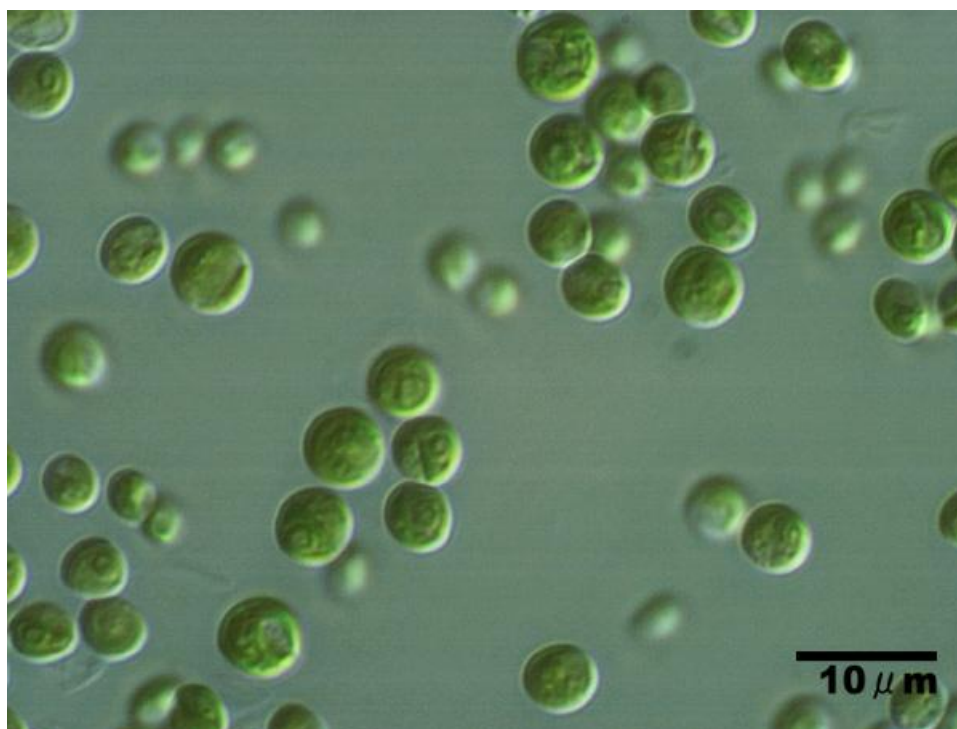
2.1 Microalga *Chlorella vulgaris*: cultivo, constituintes químicos e atividades biológicas.

As microalgas são um grupo de grande diversidade filogenética, presentes em habitats de água doce e marinhos, que possuem mecanismos adaptativos às variações de seus habitats (temperatura, salinidade e intensidade luminosa), produzindo uma gama de metabolitos secundários biologicamente ativos (MARKOU E NERANTZIS, 2013). Podem converter a energia solar em energia química, fixando CO₂, e sua eficiência pode ser dez vezes maior quando comparadas às plantas terrestres (SATHASIVAM et al., 2018).

São microrganismos com potencial atrativo para indústria farmacêutica, cosmética e nutricional (GIL-CHÀVEZ et al., 2013; WANG et al., 2015). As diferentes vias metabólicas ativadas, como estratégias de defesa por cada espécie de microalga, explicam sua imensa diversidade em termos de composição estrutural e química (MORAIS et al., 2015). A sua alta taxa de crescimento, menor ocupação de terra e água, além da capacidade de crescer sob condições adversas, como em altas condições salinas ou em áreas que não têm nutrientes requeridos por outras culturas, evidencia que as microalgas têm muitas vantagens sobre espécies oleaginosas (CHISTI, 2007, 2008).

A microalga verde *Chlorella vulgaris* (Figura 1), unicelular, esférica, microscópica (diâmetro de 2-10 µm) e de água doce, pertence ao filo Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales e família Chlorellaceae (SAFI et al. 2014). Sua forma reprodutiva é rápida (autósporo), sua reprodução é exclusivamente assexuada; em 24 horas uma célula de *Chlorella* se reproduz em ótimas condições pela auto-esporulação (YAMAMOTO et al., 2004).

Figura 1. Microalga *Chlorella vulgaris*.



(Fonte: ALGAL RESOURCE DATABASE:
<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?stockNo=NIES-642>)

2.1.1 Cultivo da *Chlorella vulgaris*

O cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* é uma forma promissora de geração de biomassa com potencial energético para as mais diversas aplicações. É capaz de combinar técnicas autotróficas e heterotróficas para o seu crescimento, sendo chamado de cultivo mixotrófico, o qual assimila simultaneamente fontes inorgânicas e orgânicas de carbono (LEUPOLD et al., 2013). Diferentes estudos já foram realizados cultivando *C. vulgaris* em resíduos, como: suinocultura (JI et al., 2011, 2013; MARJAKANGAS et al., 2015), laticínios (ABREU et al., 2012; QIN et al., 2014; SHI et al., 2016), soro de leite, vinhaça e milhocina (MELO et al., 2018). Estudos demonstram que as condições mixotróficas aumentam o conteúdo e produtividade dos lipídios e proteínas em *Chlorella* sp. (ABREU et al., 2012; WAN et al., 2011;).

A utilização de meios de cultura alternativos, como subprodutos agroindustriais, tem base em meios de cultura de baixo custo e considerável disponibilidade. São apresentados como uma opção sustentável na produção de

microalgas, como efluentes de biodigestores, lodo digerido, esgoto doméstico esterilizado, resíduos de suinocultura, soro de leite hidrolisado, altos níveis de amônia, água residual artificial, glicerol, milhocina (FENG et al., 2011; HE et al., 2013; ISLETEN-HOSOGLU E ELIBOL, 2017; KONG et al., 2012). São ricos em compostos que aumentam significativamente a produção de biomassa, agregam valor, encurtam o ciclo de crescimento, além de ser uma alternativa de tratamento para remoção de poluentes (CARVALHO et al., 2019; CHINNASAMY et al., 2010; GODOS et al., 2009; PARK et al., 2012;).

A milhocina é um subproduto agroindustrial proveniente do processamento do milho, sua composição é muito variável, dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento, dentre os compostos são encontrados aminoácidos, vitaminas, polipeptídios, açúcares e minerais, e alguns destes são úteis como fonte natural de nitrogênio, com baixo custo (CHIANI et al., 2010; DOMINGOS, 2009;). Tem sido utilizada com sucesso na produção de ácido láctico (LIU et al., 2010), enzimas e etanol (SILVEIRA et al., 2001), para o crescimento de cianobactérias, induzindo a produção de bioativos, como proteases (BARROS et al., 2016) e enzimas fibrinolíticas (SOUZA et al., 2016).

2.1.2 Constituintes químicos da *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é amplamente reconhecida por seu alto conteúdo lipídico (MIAO, 2016), em que durante o seu ciclo de crescimento pode atingir 5-40% em relação à biomassa (BECKER, 1994), sendo encontrados predominantemente glicolipídios, ceras, hidrocarbonetos, fosfolipídios e ácidos graxos (LEE, 2008; HU et al., 2008). Dentre os carboidratos, o amido é o polissacarídeo mais abundante para *C. vulgaris*. Entre os pigmentos essa microalga apresenta a clorofila com maior abundância, contendo quantidades importantes de carotenoides (SAFI et al., 2014).

Dependendo do modo de cultivo, a biomassa de *C. vulgaris* pode apresentar altos teores de proteínas, com valores entre 42-58% do peso seco da biomassa (SAFI et al., 2014). Diversas proteínas e enzimas foram relatadas nos extratos de *Chlorella*, como: nitrato-redutase, catalase, glicoproteínas, proteases, alcalases (CHU et al., 2006). O seu perfil de aminoácidos essenciais das proteínas extraídas, compara-se aos padrões recomendados pela Organização Mundial de

Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), sendo uma valorização adicional ao mercado industrial, especialmente alimentar (AVILA-LEON, 2010; BECKER, 2004; FAO/WHO, 1991).

A biomassa obtida de cultivos autotróficos ou heterotróficos pode apresentar diferentes metabólitos secundários, tais como flavonoides, saponinas, taninos, compostos fenólicos e terpenos (DANTAS et al., 2015; JAYSHREE et al., 2016; UMA et al., 2011; YADAVALLI et al., 2018). Esses metabólitos podem atrair considerável interesse biotecnológico por causa de seus potenciais efeitos benéficos sobre a saúde humana e animal no controle de doenças.

2.1.3 Atividades biológicas da *Chlorella vulgaris*

As substâncias presentes nos extratos de microalgas contêm propriedades farmacológicas com atividade biológica, que podem reduzir a inflamação e estimular a cicatrização, contribuindo significativamente para o processo de aceleração e reparo tecidual (YASUKAWA et al., 1996).

As atividades biológicas descritas para o gênero *Chlorella* incluem a redução de inflamações, atividade antioxidante, antitumoral (ZHANG et al., 2019). Como suplemento alimentar apresentou efeitos benéficos ao crescimento, imunidade e reconstrução tecidual (GUZMAN et al., 2001). A inclusão dietética durante 6 semanas aumentou a fagocitose, bem como a expressão de RNAm de interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon - γ (IFN- γ) (CHENG et al., 2017). Regulação das expressões gênicas para alterar atividades celulares, como: migração celular, deposição de matriz extracelular e o sucesso final da regeneração tecidual (ZHANG et al., 2012).

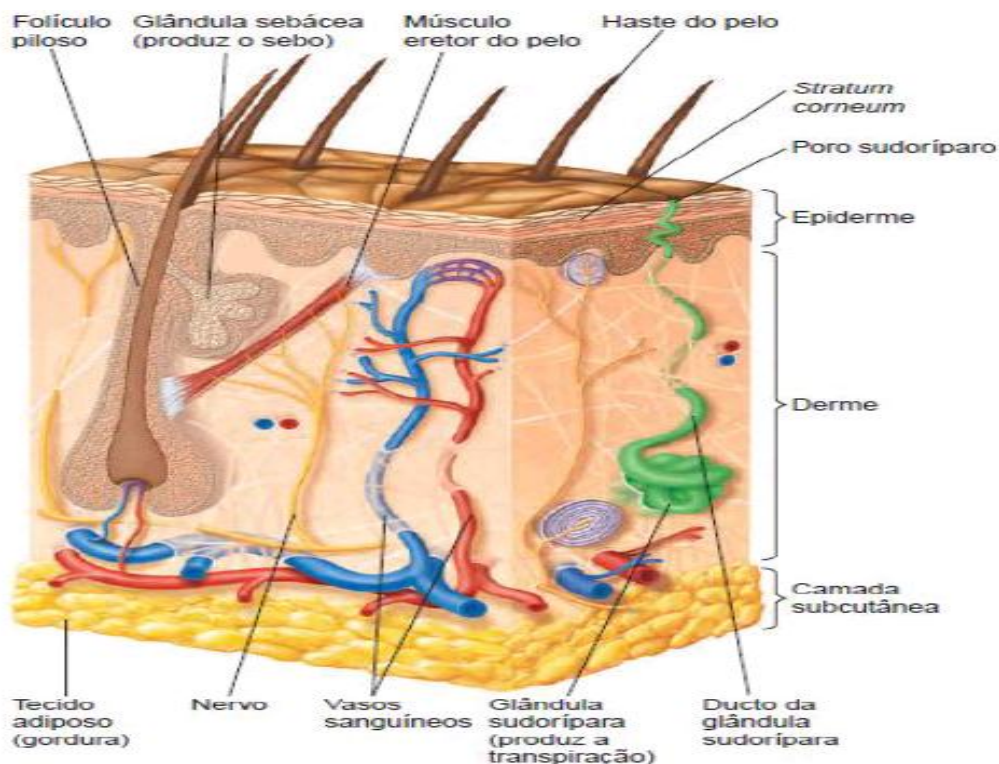
Estudos ainda demonstram que a microalga é um potente modificador de resposta imune celular, pela sua capacidade de potencializar as defesas do hospedeiro aumentando a hematopoiese principalmente de células progenitoras de macrófagos e a ativação de macrófagos maduros (JUSTO et al., 2001). Jayshree et al., (2016) identificaram os flavonoides como agentes na atividade anti-inflamatória, antiproliferativa e anticancerígena, bem como alguns esteróides de extratos de *Chlorella* foram capazes de reduzir a inflamação e o desenvolvimento de tumor na pele, sugerindo que esses compostos bioativos

apresentam a capacidade de interferir no processo de cicatrização (YASUKAWA et al., 1996).

2.2 A pele e o processo de cicatrização

A pele é o maior órgão humano e possui uma área de aproximadamente de 2m^2 , apresenta pH variável entre 4,5 e 6,0, dependendo da região do corpo ou da idade, com três camadas diferentes: epiderme, derme e hipoderme (Figura 2) (CASSANO E TROMBINO, 2017; KHALILI et al., 2018; LEONARDI et al., 2002; SAND et al., 2009). A epiderme porção epitelial composta por queratinócitos; a derme, porção conjuntiva mais profunda de células do tecido conjuntivo denso, integrada majoritariamente pela associação complexa entre fibroblastos e matriz extracelular (MEC), além dos apêndices cutâneos (pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas), fibras nervosas e vasos sanguíneos. A epiderme e a derme são separadas por uma fina camada comumente denominada membrana basal. Subjacente à derme encontra-se a hipoderme, uma camada frouxa de tecido adiposo cuja função é ancorar as demais camadas da pele e servir como conexão entre os tecidos e órgãos adjacentes (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Figura 2. A estrutura da pele humana.

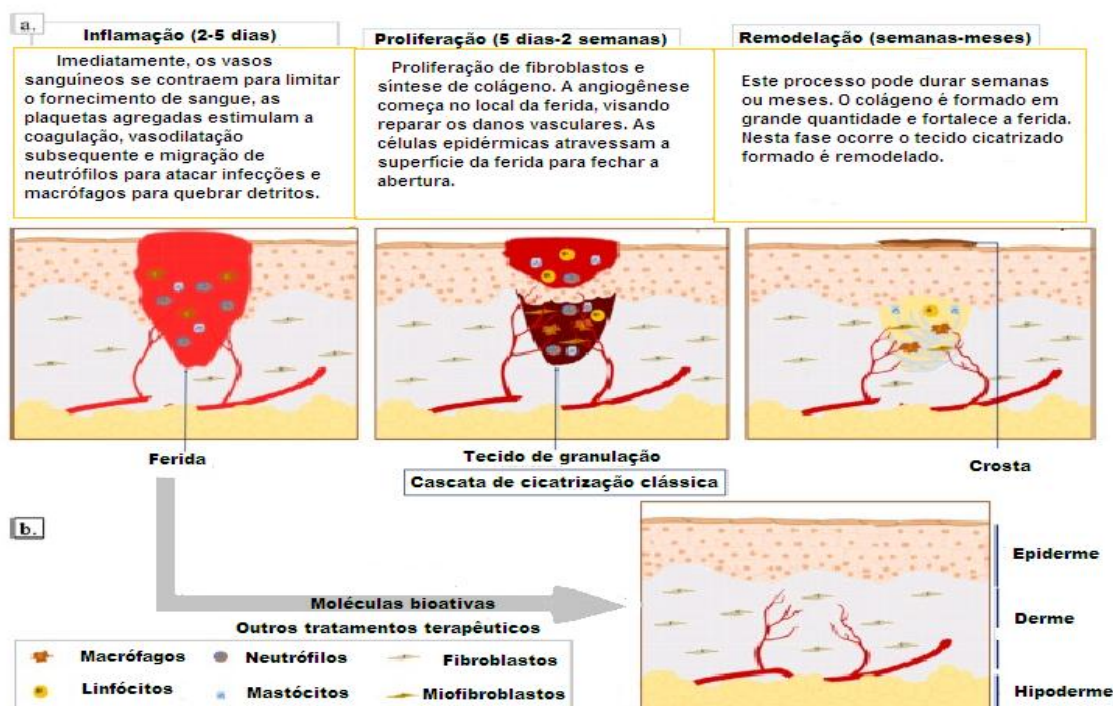


Fonte: Tortora et al. (2012).

A desintegração na função defensiva da pele pode ser resultado direto de danos térmicos ou físicos na pele (DHIVYA et al., 2015; GHOMI et al., 2019). Para reestruturar ocorre a cicatrização, que é um processo dinâmico e multifacetado, em humanos ou animais, governado por fases celulares e humorais para que ocorra o reparo da lesão, que podem ser classificados em três fases sequências, mas sobrepostas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (Figura 3) (LINDLEY et al. 2016).

O processo para reconstruir a integridade inicia-se com o controle do sangramento do local da ferida, plaquetas são agregadas e consequentemente um tampão é formado e ocorre a migração de células inflamatórias para o local da ferida. A transição da fase inflamatória para a proliferativa é marcada pela migração e proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ocorrendo a angiogênese, levando à reepitelização e formação do tecido de granulação. A proliferação dos fibroblastos é estimulada pelo pH ácido nos tecidos lesados (LAUREANO E RODRIGUES, 2011). Finalmente, a recuperação do tecido ocorre pela redução da presença de células, vascularização e deposição de colágeno, consistindo a fase de remodelação, que depende de fatores como o pH e a colonização bacteriana do local da ferida (LAUREANO E RODRIGUES, 2011; MANDELBAUM et al., 2003; PEREIRA et al., 2016).

Figura 3. Etapas do processo de cicatrização.



Fonte: Adaptado de Chandika et al. (2015).

O processo de cicatrização de feridas pode ser afetado por fatores locais e sistêmicos. Os fatores locais incluem a radiação, hipotermia, infecção e demanda de oxigênio para os tecidos. Por outro lado, os fatores sistêmicos estão relacionados ao estado de saúde do paciente (GHOMI et al., 2019). Além disso, a má nutrição e a idade são fatores que podem prolongar a cicatrização (DHIVYA et al., 2015).

A ferida pode ser classificada como aguda ou crônica de acordo com o processo e duração da cicatrização, na primeira ocorre em um tempo previsível entre 8 e 12 semanas. Já as feridas crônicas não cicatrizam em um período de tempo fixo (GHOMI et al., 2019), como úlceras venosas e arteriais, úlceras por pressão e úlceras diabéticas, gerando imobilidade do paciente, comprometimento da circulação e doenças sistêmicas (SHILO et al., 2013). As feridas agudas ou crônicas são desafios para o sistema de saúde, uma vez que consomem uma grande quantidade de recursos e profissionais para o tratamento, em que requerem abordagens multidisciplinares para alcançar resultados eficazes (FRYKBERG E BANKS, 2015).

Segundo o World Care Market (2017), o mercado de tratamento de feridas deve atingir US \$ 22,81 bilhões em 2022, em comparação ao ano de 2018 de US \$ 18,99 bilhões. Os fatores que impulsionam esse aumento incluem o aumento na expectativa de vida, o qual é acompanhado pelo aumento do risco de doenças e incidência de feridas agudas e crônicas, as quais requerem atenção clínica, e ao aumento do número de acidentes de trânsito.

A disponibilidade de curativos que são capazes de alcançar a cicatrização adequada, ainda é limitada, apesar dos grandes avanços terem sido alcançados se faz necessárias pesquisas para minimizar os custos, aperfeiçoar os recursos já existentes, no contexto da aceleração e no melhoramento do processo de reparação, bem como proporcionar facilidade de utilização, menor risco de lesão tissular e atividade antiflogística (SILVA et al., 2008). Com isso, facilitar o acesso ao maior número de pessoas mediante ao aproveitamento de diversos tipos de matérias-primas (ERENO, 2003; KTARI et al., 2017).

2.2.1 Produtos cicatrizantes

A utilização de produtos de origem animal ou vegetal para tratamento de feridas é uma prática observada desde os primórdios da humanidade, em que sofreu modificações para melhores resultados. Existem relatos que na Mesopotâmia era usada argila para tratar feridas em 2500 a.C, já na Grécia era usado vinho ou vinagre para limpar feridas em 460-370 a.C (DAUNTON et al., 2012). No final do século 20, curativos oclusivos foram preparados para fornecer condições estáveis e proteção à ferida. De acordo com a forma física, os produtos cicatrizantes estão disponíveis na forma de pomadas, filmes, espumas, géis, os quais podem conter compostos bioativos de origem animal, vegetal ou sintética (GHOMI et al., 2019).

O produto de origem animal que tem maior importância para aceleração do processo de cicatrização é a esponja de colágeno (GUMARGALIEVA et al., 2014), de origem porcina, é absorvida completamente pelo organismo, porém apresenta alto custo de produção e aquisição. Os curativos baseados em compostos de origem vegetal desempenham destaque na literatura, pois não apresentam toxicidade e podem ser utilizados por um longo período de tempo (RADHIKA E ARUN KUMAR, 2017; SUGANYA et al., 2011). A demanda por matérias-primas de baixo custo para cicatrização levou à produção de produtos sintéticos com base

em polímeros, como o poliuretano (GUMARGALIEVA et al., 2014), o qual tem sido amplamente utilizado devido à sua biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e alta permeabilidade (BAHRAMI et al, 2019; SAHRARO et al., 2016; XU et al, 2014, 2016).

Enzimas são utilizadas em terapias para remover resíduos celulares e tecido necrosado, como a collagenase extraída da cultura de *Clostridium histolyticum*, capaz de quebrar as ligações do peptídeo do colágeno (MARTÍN-FERRERO et al., 2013). Seu uso no tratamento de feridas, úlceras e escaras promove a formação de novos tecidos, a reepitelização e não afeta o colágeno saudável e o tecido recém-formado (FRADE et al., 2012). Diversas formas farmacêuticas para sua aplicação terapêutica, como creme ou pomada estão disponíveis (BRASILEIRO et al., 2008).

Ao longo dos anos, foram desenvolvidas diferentes medicamentos a partir de moléculas bioativas derivadas de microrganismos para superar as limitações ou para otimizar a administração das fontes convencionais. A utilização de biomoléculas ativas presentes em microrganismos fotossintetizantes pode ser uma potencial fonte na produção de agentes cicatrizantes, uma vez que um só tipo de tratamento não preenche os requisitos para ser aplicado a todo o tipo de ferida cutânea. O uso de produtos derivado de algas tem considerável potencial terapêutico, proporcionando dessa forma um crescente interesse em estudar e entender como esses produtos naturais podem contribuir para o processo da cicatrização, com o objetivo contribuir e/ou complementar as formulações já existentes (SERAFINI et al., 2014).

Algumas pesquisas com propostas de tratamento apresentaram resultados significativos, como os experimentos de Kordjazi et al. (2013), onde demonstraram uma melhora significativa, síntese de colágeno e regeneração da epiderme usando polissacarídeos sulfatados extraídos das algas *Padina tetrastrum* e *Padina boergeri*, utilizando pomadas como veículo em feridas de ratos. Estudo realizado utilizando uma formulação contendo polissacarídeos sulfatos das algas marinhas *Caulerpa racemosa*, *Cryptonemia crenulata* e *Gracilaria birdiae* demonstrou uma atividade cicatrizante estatisticamente significativa (RIBEIRO, 2016).

O potencial pró-cicatrizante de lectinas isoladas a partir da alga vermelha *Bryothamnion seaforthii* já foi observado em feridas agudas em camundongos. Sendo sugerido como potencial médico no tratamento de feridas agudas por induzir células do sistema imune e por promover a oclusão mais rápida da lesão (NASCIMENTO-NETO et al., 2012).

A cicatrização de feridas a partir de microalgas ainda não é bem relatada na literatura. Hidalgo-Lucas et al. (2014) investigaram a cicatrização de feridas utilizando ROQUETTE *Chlorella* sp., pó comercial produzido pela ROQUETTE Frères, através de aplicação cutânea e administração oral, demonstrando um potencial médico para doenças de pele. Em adição, Melo et al. (2019) realizaram o estudo de um hidrogel à base de *Chlorella vulgaris* em condições autotrófica e mixotrófica, observando maior depósito de colágeno e presença de apêndices cutâneos, além da diminuição de células inflamatórias utilizando o extrato mixotrófico, sugerindo como uma nova formulação tópica para diversos distúrbios de pele.

Os hidrogéis são veículos feitos de materiais hidrofílicos e insolúveis. Eles contêm de 70 a 90% de água, portanto são capazes de criar um ambiente úmido, sendo usados para o tratamento de feridas secas (DHIVYYA et al., 2015; VOWDEN et al., 2017). O ambiente úmido da ferida facilita o desbridamento autolítico do tecido necrótico. Os hidrogéis podem ser utilizados em queimaduras, feridas cirúrgicas, úlceras por pressão.

2.3 A importância das caracterizações físico-químicas e reológicas das formulações

A caracterização da matéria-prima é de grande importância, uma vez que permite o conhecimento da composição química, podendo ajudar a direcionar na aplicação desses compostos para as diversas atividades biológicas (DANTAS et al., 2015). As formulações constituídas de ativos naturais devem se adequar as recomendações preconizadas nas resoluções das agências reguladoras, que determinam quais os controles que devem ser empregados em cada fase da idealização, avaliação e obtenção do medicamento (SILVA-JUNIOR E PEREIRA, 2009).

Os produtos destinados ao uso na pele devem apresentar consistência pseudoplástica, que tem a característica de alta espalhabilidade com modificação da sua forma com pequeno esforço mecânico e com adaptação ao relevo do local de aplicação (CARVALHO et al., 2010; PESSANHA, 2011), sem proporcionar incômodo ao paciente. Por outro lado, um creme tópico precisa ser mais viscoso para que o medicamento se mantenha na superfície da pele por mais tempo. Isto é importante para a permeação do composto ativo, caso contrário, será um desperdício se a aplicação tópica durar apenas alguns minutos e facilmente eliminada pelo movimento físico. A aplicação tópica é bem conhecida por sua baixa permeabilidade e lenta penetração na pele (DAS et al., 2013). Portanto, o perfil reológico da forma da formulação tópica é importante para maximizar o período de contato entre o medicamento e a pele (ABID-HUSSAIN et al., 2012). Os veículos escolhidos devem permitir que o medicamento permaneça no local de ação desejado por um tempo adequado e em uma concentração eficaz (MALATHI et al., 2014).

Um medicamento cicatrizante deve ser selecionado com base no tipo da ferida, na profundidade, em sua localização e extensão da ferida, e observando possíveis infecções (BUDOVSKY et al., 2015). Uma formulação ideal para feridas deve seguir as seguintes características: (1) controlar a umidade ao redor da ferida, (2) proporcionar a troca de gases, (3) eliminar do excesso de exsudatos, (4) proteger a ferida de infecções e microrganismos, (5) diminuir a necrose da superfície da ferida, (6) ter proteção mecânica, (7) facilidade de remoção, (8) ser biocompatível, biodegradável e não tóxico (GHOMI et al., 2019).

2.4 Teste de estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade são necessários aos produtos farmacêuticos, uma vez que fornecem o comportamento do produto frente às variações do ambiente a ser submetido em um intervalo de tempo, em que visa definir o prazo de validade e as condições de armazenamento (BRASIL, 2015; CARVALHO et al., 2005; USP XXIX, 2006). A estabilidade desses produtos pode ser influenciada pela temperatura, umidade e luminosidade, e de outros relacionados ao produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, processo de fabricação, bem como pela composição da embalagem escolhida (USP XXIX, 2006). Sendo a temperatura de grande

importância, pois pode causar instabilidade aos constituintes químicos, já que fornece energia para acelerar as reações químicas de degradação (CAPUCHO, 2007). Os produtos farmacêuticos devem se adequar a Resolução RDC nº 318/2019 que estabelece os critérios para a realização dos estudos de estabilidade dos insumos farmacêuticos a serem comercializados no Brasil.

Essas avaliações assumem cada vez mais importância, pois permitem compreender o veículo na fase de desenvolvimento, controlar a qualidade da matéria-prima, prever as variações que possam tornar a formulação instável durante o período de armazenamento e garantir a consistência do produto na liberação e penetração cutânea das biomoléculas (ALMEIDA E BAHIA, 2003; GASPAR E MAIA-CAMOS, 2003).

Dessa forma, devido a alta incidência de lesões cutâneas por diferentes doenças ou acidentes, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de propiciar um tratamento alternativo e/ou complementar aos pacientes, levando em consideração a importância de estudos de estabilidade e da caracterização da matéria-prima para que as formulações farmacêuticas tenham melhor eficácia e baixo custo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

Caracterização do extrato da microalga *Chlorella vulgaris* e do gel para uso em feridas cutâneas

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar triagem fitoquímica do extrato da microalga;
- Precipitar e purificar proteínas do extrato da microalga;
- Avaliar a atividade cicatrizante das frações proteicas *in vitro*;
- Analisar o extrato e um gel à base de extrato de *C. vulgaris* por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR);
- Determinar o melhor pH, espalhabilidade, viscosidade de um gel à base de extrato de *C. vulgaris*;
- Avaliar a estabilidade acelerada e de longa duração, conforme a resolução RDC nº 318 de 2019 da ANVISA;

5. Referências

- ABID HUSSAIN GMK, SYED UMER JAN, SHEFAAT ULLAH SHAH, KIFAYATULLAH SHAH,, MUHAMMAD AKHLAQ NR, ASIF NAWAZ AND ABDUL WAHAB. 2012. Effect of olive oil on transdermal penetration of flurbiprofen from topical gel as enhancer. **Pak J Pharm Sci.** v.25, p.365-9.
- ABREU, A.P., FERNANDES, B., VICENTE, A.A., TEIXEIRA, J., DRAGONE, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology.** v.118, p.61-66.
- ALBAAYIT, SFA.; ABBA, Y.; RASEDEE, A.; ABDULLAH, N. 2015. Effect of *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae) leaf extract on wound healing and antioxidant activity in rats. **Drug Design, Development and Therapy.** v.9, p.3507–3518.
- ALGAL RESOURCE DATABASE (2017) *Chlorella vulgaris*. Disponível em: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?stockNo=NIES-642> Acessado em 17 de Julho de 2019.
- ALMEIDA, I.F; BAHIA, M.F. 2003. Reologia: interesse e aplicação na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.3, p.96-100.
- AVILA-LEON, I.A. 2010. Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 99 p.
- BARROS, PDS; COSTA E SILVA, PE; VIANA MARQUES, DA; HERCULANO, PN; BEZERRA, RP; PORTO, ALF. 2016. Subproduto agroindustrial milhocina usado como uma fonte de indução da produção de proteases por *Arthrospira platensis*. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** Caxias do Sul, RS.
- BAHRAMI, N.; NOURI KHORASANI, S.; MAHDAVI, H.; GHIACI, M.; MOKHTARI, R. 2019. Low-pressure plasma surface modification of polyurethane films with chitosan and collagen biomolecules. **Journal of Applied Polymer Science.** v.136, p.47567.
- BECKER EW. 1994. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- BECKER, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition, Handbook of Microalgal Culture: **Biotechnology and Applied Phycology**, v.312.
- BRASIL. 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Brasília: ANVISA.
- BRASILEIRO BG, PIZZIOLO VR, MATOS DS, GERMANO AM, JAMAL CM. 2008. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* v.44, p.329-336.
- BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. 2015. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.23, n.2, p.171–83.
- CAPUCHO, H.C. 2007. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. Dissertação – Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- CARVALHO, J.P.; SANTOS, A.S.; TEIXEIRA, C.S.; NOGUEIRA, M.S. 2005. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Revista Fármacos & Medicamentos.** Racine. São Paulo, v.34, n.VI, p.22-27.
- CARVALHO, J.C.; SYDNEY, E.B.; TESSARI, L.F.A.; SOCCOL, C.R. 2019. Chapter 2 - Culture media for mass production of microalgae. **Biomass, Biofuels, Biochemicals**, p.33-50.
- CARVALHO, F.C; BARBI, M.S; SARMENTO, V. H. V; CHIAVACCI, L. A; NETTO, F. M; GREMIAO, M. P. D. 2010. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 62, n.4, p. 430–439.

- CASSANO, R.; TROMBINO, S. 2017. Trehalose-based hydrogel potentially useful for the skin burn treatment. **Journal of Applied Polymer Science**. v.134, p.44755.
- CHANDIKA, P; KO, SC; JUNG, WK. 2015. Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration **International Journal of Biological Macromolecules**, v.77, p.24–35.
- CHENG, D.; WAN, Z.; ZHANG, X.; LI, J.; LI, H.; WANG, C. 2017. Dietary *Chlorella vulgaris* ameliorates altered immunomodulatory functions in cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. **Nutrients**, v.9, p.708.
- CHIANI, M., AKBARZADEH, A., FARHANGI, A., MEHRABI, M.R., 2010. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. Pak. **International Journal of Biological Sciences**. v.13, p.1151-1155.
- CHINNASAMY, S; BHATNAGAR, A; HUNT, RW.; Das, KC. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, v.101, p.3097-3105.
- CHISTI, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. v.25, p.294-306.
- CHISTI, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**. v.26, p.126-131.
- CHU, CY.; HUANG, R.; LIN, LP. 2006. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.967–973.
- DANTAS, D.M.M; COSTA, R.M.P.B; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G; GALVEZ, A.O; DRUMMOND, A.R; BEZERRA, R.S. 2015. Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. **Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences**. v.4.
- DAS B, NAYAK AK, NANDA U. 2013. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. **Int J Biol Macromol**. v.62, p.514-7.
- DAUNTON, C.; KOTHARI, S.; SMITH, L.; STEELE, D. 2012. **Wound Pract. Res**, v.20, p.174.
- DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. 2015. **Biomedicine**. v.5, p.22.
- DOMINGOS, M. 2009. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial, p.1–77.
- ERENO, D. Curativo de Borracha. 2003. **Revista Pesquisa Fapesp**, n.88, disponível em: <<http://www.fapesp.org.br/www.revistapesquisa.fapesp.br>>.
- FAO/WHO. 1973. Energy and protein requirement. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee, v.52, p.1–112.
- FAO/WHO. 1991. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation, v.92, p.1–79.
- FENG, Y; LI, C; ZHANG, D. 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v.102, p.101–105.
- FRADE MA, ASSIS RV, COUTINHO NETTO J, ANDRADE TA, FOSS NT. 2012. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.87, p.45-51.
- FRYKBERG RG, BANKS J. 2015. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Adv. Wound Care**. v.4, p.560-582.
- GASPAR, L.R; MAIA-CAMPOS, P.M.B.G. 2003. Rheological behavior and the SPC of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.250, n.1, p. 35-44.
- GAUTAM, K., PAREEK, A., AND SHARMA, D. K. 2013. Biochemical composition of green alga *Chlorella minutissima* in mixotrophic cultures under the effect of different carbon sources, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.116, p.624-627.

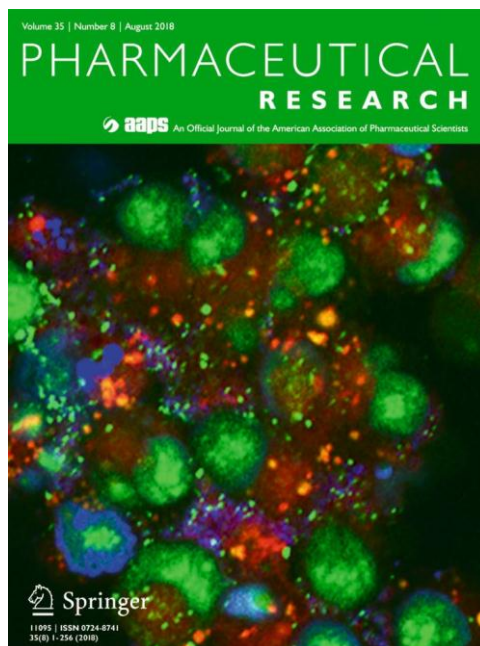
- GODOS, I. 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. **Bioresource Technology**, v.100, p.4332-4339.
- GHOMI, E.R.; KHALILI, S.; KHORASANI, S.N.; NEISIANY, R.E.; RAMAKRISHNA. S. 2019. Wound dressings: Current advances and future directions. **Journal of Applied Polymer Science**.
- GUMARGALIEVA, K.Z.; ZAIKOV, G.E. 2014. IN KEY ENGINEERING MATERIALS, VOLUME 2: INTERDISCIPLINARY CONCEPTS AND RESEARCH; KAJZAR, F.; PEARCE, E.M.; TUROVSKIJ, N. A.; MUKBANIANI, O.V., Eds., CRC Press: Oakville,.
- GUZMAN, S.; GATO, A.; CALLEJA, J.M. 2001. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*, **Phytotherapy Research** v.15, p.224–230.
- HE, PJ; MAO, B; SHEN, CM; SHAO, LM; LEE, DJ; CHANG, JS. 2013. Cultivation of *Chlorella vulgaris* o waster water containing high levels of ammonia for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.129, p.177–181.
- HIDALGO-LUCAS, S.; BISSON, JF.; DUFFAUD, A.; NEJDI, A.; GUERIN-DEREMAUX, L.; BAERT, B. 2014. Benefits of Oral and Topical Administration of ROQUETTE *Chlorella sp.* on Skin Inflammation and Wound Healing in Mice. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.13, p.93-102.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; et al. 2008. Microalgal triacylglycerols as feeds tocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**; v.54, p.621–39.
- HTET, A. N., NOGUCHI, M., NINOMIYA, K., TSUGE, Y., KURODA, K., KAJITA, S., MASAI, E., KATAYAMA, Y., SHIKINAKA, K., OTSUKA, Y., and other 3 authors. 2018. Application of microalgae hydrolysate as a fermentation medium for microbial production of 2- pyrone 4, 6-dicarboxylic acid, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.125, p.717-722.
- ISLETEN-HOSOGLU, M.; ELIBOL, M. 2017. Bioutilization of Cheese Whey and Corn Liquor b Heterotrophic Microalgae *Cryptocodinium cohnii* for Biomass and Lipid Production. **Akademik Gıda** v.15, p. 233-241.
- JABEENA, A.; REEDERA, B.; SVISTUNENKOA, D.; HISAINDEEB, S.; ASHRAFB, S.; AL-ZUHAIRC, S.; BATTAHA, S. 2019. Effect of the Photodynamic Therapy Applications with Potent Microalgae Constituents on Several Types of Tumor. **Innovation and Research in BioMedical engineering**, v.40, p.51–61.
- JAYSHREE, A.; JAYASHREE, S.; THANGARAJU, N. 2016. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**; v.78, p.575–81.
- JI, M.-K.; KIM, H.-C.; SAPIREDDY, V.R.; YUN, H.-S.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; CHOI, J.; LEE, W.; TIMMES, T.C.; INAMUDDIN, JEON, B.-H. 2013. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.2701-2710.
- JI, M.-K.; RAGHAVULU, V.S.; YUN, H.-S.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; CHOI, J.; JEON, B.-H. 2011. Effects of piggery wastewater on *Chlorella vulgaris* YSW 004 growth, nutrient uptake, and fatty acid production. Abstr. Pap. Am. Chem. Soc. v.242.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. 2013. **Histologia Básica**. 12^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.556.
- JUSTO, GZ; SILVA, MR. QUEIROZ, MLS. 2001. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v.23, n.1, p.119-132.
- KHALILI, S.; NOURI KHORASANI, S.; RAZAVI, M.; HASHEMI BENI, B.; HEYDARI, F.; TAMAYOL, A. 2018. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.106, p.370.
- KONG, WB.; YANG, H.; CAO, YT.; SONG, H.; HUA, F.; XIA, C. 2012. Effect and glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Food Technology and Biotechnology**. v.51, p.62-69.

- KORDJAZI, M.; SHABANPOUR, B.; ZABIHI, E.; FARAMARZI, MA.; FEIZI, F.; GAVLIGHI, HA. 2013. Sulfated Polysaccharides Purified from Two Species of *Padina* Improve Collagen and Epidermis Formation in the Rat. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v.2, n.4, p.157.
- KTARI, N.; TRABELSI, I.; BARDAA, S.; TRIKI, M.; BKHAIRIA, I.; SALEM, RB. S.; NASRI, M.; SALAH, RB. 2017. Antioxidant and hemolytic activities, and effects in rat cutaneous wound healing of a novel polysaccharide from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.625–634.
- LEE, R.E. Phycology. 4th ed. Cambridge, England; New York: Cambridge University Press; 2008.
- LEONARDI, G.R.; GASPARI, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G.M. 2002. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. Rio de Janeiro.
- LEUPOLD, M.; HINDERSIN, S.; GUST, G.; KERNER, M.; HANELT, D. 2013. Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, v.25, p.485–95.
- LIU, B.; YANG, M.; QI, B.; CHEN, X.; SU, Z.; WAN, Y. 2010. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v.52, p.212-219.
- LI, H.; DUANN, P.; LIN, P.; ZHAO, L.; FAN, Z.; TAN, T.; ZHOU, X.; SUN, M.; FU, M.; ORANGE, M.; SERMERSHEIM, M.; MA, H.; HE, D.; STEINBERG, S.M.; HIGGINS, R.; ZHU, H.; JOHN, E.; ZENG, C.; GUAN, J.; MA, J.J. 2015. Modulation of Wound Healing and Scar Formation by MG53 Protein-mediated Cell Membrane Repair. **Journal of Biological Chemistry**. v.290, n.40, p.24592–24603.
- LINDLEY LE, STOJADINOVIC O, PASTAR I, TOMIC-CANIC M. 2016. Biology and biomarkers for wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**; v.138, p.18S-28S.
- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. 2011. Cicatrização de Feridas, *Revista da SPDV*. v.69, n.3.
- MAGRO, C.D.; DEON, M.C.; THOME, A.; PICCIN, J.S.; COLLA, L.M. 2013. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. **Química Nova**, v.36, n.8, p.1139-1145.
- MALATHI K, JEEVREKHA M, RAJULA MPB, et al. 2014. Local Drug Delivery –A Targeted Approach. **International Journal of Medicine and Biosciences**. v.3, n.2, p.29-34.
- MARJAKANGAS, J.M., CHEN, C.-Y., LAKANIEMI, A.-M., PUHAKKA, J.A., WHANG, L.-M., CHANG, J.-S., 2015. Simultaneous nutrient removal and lipid production with *Chlorella vulgaris* on sterilized and non-sterilized anaerobically pretreated piggery wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v.103, p.177-184.
- MARKOU, G.; NERANTZIS, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, v.31, p.1532–1542.
- MARTÍN-FERRERO, M.Á.; SIMÓN-PÉREZ, C.; RODRÍGUEZ-MATEOS, J.I.; GARCÍA-MEDRANO, B.; HERNÁNDEZ-RAMAJÓ, R.; BROTAT-GARCÍA, M. **Treatment of Dupuytren's disease using collagenase from *Clostridium histolyticum***. 2013. Tratamiento de la enfermedad de Dupuytren mediante la colagenasa del *Clostridium histolyticum*. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)*. v.57, p.398-402.
- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, É.P.; MANDELBAUM, M.H.S. 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.393–410,
- MATA, T. M., MARTINS, A. A., AND CAETANO, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232.
- MELO, R.G.; ANDRADE, A.F.; BEZERRA, R.P.; CORREIA, D.S.; SOUZA, V.C.; BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; MARQUES, D.A.V.; PORTO, A.L.F. 2018. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, v.204, p.344-350.

- MIAO et al. 2016. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater, **International Biodeterioration & Biodegradation**,
- MORAIS, M.G.; VAZ BDA, S.; MORAIS, E.G.; COSTA, J.A. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed Research International**.
- NASCIMENTO-NETO, LG.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, SR.; SILVA, BR.; ARRUDA, FVS.; NAGANO, CS. 2012. Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. **Marine Drugs**, v.10, p.1936-1954.
- NASCIMENTO, RAL.; ALVES, MHME.; FREITAS, JHES.; MANHKE, LC.; LUNA, MAC.; SANTANA, KV.; NASCIMENTO, AE.; SILVA, CAA. 2015. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCPMWFCC 1261). **Exacta**, Belo Horizonte, v.8, n.1, p.15-29.
- PARK, K.C., WHITNEY, C., MCNICHOL, J.C., DICKINSON, K.E., MACQUARRIE, S., SKRUPSKI, B.P., ZOU, J., WILSON, K.E., O'LEARY, S.J.B., MCGINN, P.J. 2012. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: Potential applications for wastewater remediation for biofuel production. **Journal of Applied Phycology**. v.24, p.339–348.
- PEREIRA, L.P.; MOTA, M.R.L.; BRIZENO, L.A.C.; NOGUEIRA, F.C.; FERREIRA, E.G.M.; PEREIRA, M.G.; ASSREUY, A.M.S. 2016. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: role of TNF, IL-1, NO, TGF. **Journal of Ethnopharmacology**, v.187, p.213–223.
- PESSANHA, A.F.V. 2011. Desenvolvimento de formas farmacêuticas semi-sólidas à base de óleo de linhaça (*Linus usitatissimum* L.) com ação cicatrizante para tratamento e prevenção de úlceras de pressão. Dissertação – Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.
- QIN, L., SHU, Q., WANG, Z., SHANG, C., ZHU, S., XU, J., LI, R., ZHU, L., YUAN, Z. 2014. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.172, p.1121-1130.
- SAEIDNIA, S; GOHARI, A.R; SHAHVERDI, A.R; PERMEH, P; NASIRI, M; MOLLAZADEH, K. 2009. Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian gulf. **Pharmacognosy Research**. v.1, p.428–30.
- SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.Y.; VACA-GARCIA, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.35, p.265–278.
- SAHRARO, M.; YEGANEH, H.; SORAYYA, M. 2016. **Materials Science and Engineering C**, v.59, p.1025.
- SAND, M.; GAMBICHLER, T.; SAND, D.; SKRYGAN, M.; ALTMAYER, P.; BECHARA, F. G. J. 2009. **Journal of Dermatological Science**, v.53, p.169.
- SHI, J., PANDEY, P.K., FRANZ, A.K., DENG, H., JEANNOTTE, R. 2016. *Chlorella vulgaris* production enhancement with supplementation of synthetic medium in dairy manure wastewater. **Amb. Express** 6.
- SILVA-JUNIOR, J.O.C; PEREIRA, N.L. 2009. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.1, p.3-9.
- RADHIKA, P.; ARUN KUMAR, K. 2017. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v.5, p.1616.
- RIBEIRO, N.A. 2016. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: formulação de géis e análise dos seus efeitos na cicatrização em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.
- SATHASIVAM, R; RADHAKRISHNAN, R; HASHEM, A; ABD –ALLAH, E. F. 2018. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Science**.

- SERAFINI, M.R., GUIMARAES, A.G., QUINTANS-JUNIOR, L.J., NUNES, P.S., MATOS, I.G., SRAVANAN, S., SOUZA, DE, ARAUJO, A.A. 2014. Recent patents on medicinal plants/ natural products as a therapeutic approach to wounds and burns healing. **Recent Patents on Biotechnology**, v.8, p.231–239.
- SHILO, S; ROTH, S; AMZEL, T. et al. 2013. Cutaneous wound healing after treatment with plant-derived human recombinant collagen flowable gel. **Tissue Engineering**. v.19, p.1519-1526.
- SILVA, JPA, SAMPAIO, LS, OLIVEIRA, LS, REIS, LA. 2008. Plantas medicinais utilizadas por portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2 para provável controle glicêmico no município de Jequié-Ba. **Revista Saúde.com**, v.4, n.1, p.10-18.
- SOUZA, ATV.; COSTA E SILVA, PE.; BARROS, PDS.; HERCULANO, PN.; PORTO, ALF.; BEZERRA, RP. 2016. Otimização da Produção de Enzimas Fibrinolíticas pela Microalga *Scenedesmus* sp. In: **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Caxias do Sul.
- SUGANYA, S.; SENTHIL RAM, T.; LAKSHMI, B.S.; GIRIDEV, V R.J. 2011. **Journal of Applied Polymer Science**, v.121, p.2893.
- TOLEDO, A.C.O, et al; 2003. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica, **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v.21, n.1/2, p.7-13.
- UMA, R; SIVASUBRAMANIAN, V; NIRANJALI, D. S. 2011. Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green microalgae, *Desmococcus olivaceus*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. **Journal Algal Biomass Utilization**, v.2, p.74–81.
- USP XXIX: United States Pharmacopeia. Convention, Rockford, MD. p.2699-2701. 2006.
- VOWDEN, K.; VOWDEN, P. SURGERY. 2017. v.35, p. 489.
- WAN, M., LIU, P., XIA, J., ROSENBERG, J.N., OYLER, G., BETENBAUGH, M.J., NIE, Z., QIU, G., 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.91, p.835–844.
- WANG, H.M.; CHEN, C.C.; HUYNH, P.; CHANG, J.S. 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v.184, p.355–362.
- XU, W.; MA, C.; MA, J.; GAN, T.; ZHANG, G. 2014. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.6, p.4017.
- XU, R.; XIA, H.; HE, W.; LI, Z.; ZHAO, J.; LIU, B.; WANG, Y.; LEI, Q.; KONG, Y.; BAI, Y. 2016. Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. **Scientific Reports**, v.6, p. 24596.
- YADAVALLI, R., PEASARI, J.R., MAMINDLA, P., PRAVEENKUMAR, MOUNIKA, S., GANUGAPATI, J. 2018. Phytochemical screening and in silico studies of flavonoids from *Chlorella pyrenoidosa*. **Informatics in Medicine Unlocked**, v.10, p.89–99.
- YAMAMOTO, M.; FUJISHITA, M.; HIRATA, A.; KAWANO, S. 2004. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Research**, v.117, p.257–264.
- ZHANG, Q.; FONG, C.C.; YU, W.K.; CHEN, Y.; WEI, F.; KOON, C.M.; LAU, K.M.; LEUNG, P.C.; LAU, C.B.; FUNG, K.P.; YANG, M. 2012. **Phytomedicine**, v.20, p.9–16.
- ZHANG, J.; LIU, L.; CHEN, F. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**.

6. Capítulo 1 – Artigo 1



Artigo a ser submetido ao periódico Pharmaceutical Research

Fator de impacto 3.896 e classificação Qualis A1

Hydrogel based on *Chlorella vulgaris* extract characterization with healing potential

Alexsandra Frazao de Andrade^a; Micalleyde Soares do Egito^b; Williana Torres Vilela^b, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa^a, Eudes Gustavo Constantino Cunha^c, Maíra Galdino da Rocha Pitta^c, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^c, Rosali Maria Ferreira da Silva^b, Ana Lúcia Figueiredo Porto^a, Raquel Pedrosa Bezerra*^a

^aDepartment of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil;

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil;

^cImmunomodulation Laboratory and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil;

Author for correspondence: rpbezerra@yahoo.com.br

Abstract

Introduction: *Chlorella vulgaris* microalgae are source of bioactives such as proteins, fatty acids, pigments and phytochemical with therapeutic activity and biotechnological applications.

Objective: The present study aimed to characterize *Chlorella vulgaris* extract and its formulation for the treatment of cutaneous wounds.

Materials and Methods: *C. vulgaris* microalgae was cultivated in a standard medium supplemented with 1% corn steep liquor. The dried biomass was at the concentration of 50 mg/mL buffer, sonicated and centrifuged to characterize the supernatant called cell extract. Characterization was performed by qualitative analysis of phytochemicals by colorimetric test and determination of total phenols by spectrophotometry expressed by gallic acid (AG). The proteins present in the extract were precipitated with ammonium sulfate, purified by ion exchange chromatography and the electrophoretic profile analyzed by SDS-PAGE gel. Hemagglutinating activity of the protein peaks obtained using bovine, equine and human ABO blood system (type A, B and O) erythrocytes was performed. The *in vitro* cytotoxicity of the extract was tested in different concentrations in primary fibroblasts. The characterization of the formulations was performed through organoleptic properties, pH, spreadability and rheological profiles. The excipients of the formulation were submitted to Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for analysis of the structure of the molecules, and to a thermogravimetric analyzer (TGA) for thermal stability analysis.

Results and Discussion: Terpenes and total phenol content of 1.35 ± 0.18 mg/g AG were detected in the extract. In the protein purification were obtained two peaks, the first eluted at 0.15 M of NaCl and the second eluted at 1.0 M. Only the first peak showed protein content of 250 μ g/mL, hemagglutinating activity of $\geq 2^5$ for erythrocyte type B and a single band with approximately 36 kDa. The cell extract presented cytocompatibility with primary fibroblasts during 48h. The formulations had a green colour, smooth texture, slightly cloudy, characteristic smell of microalgae extract and pH s in the range of 7.09 ± 0.07 . The results of the spreadability and viscosity test indicate that the formulation can easily flow and spread over the applied area. From the FT-IR it was possible to observe the presence of amine, carbohydrates and terpenes in the cell extract. According to the TGA curve, the percentage of final cell extract mass loss was 23.56%, occurring at 218.64 °C. Carbopol had a mass loss of 19.39%, occurring at 301.62%. The loss in mass of

methylisothiazolinone was 94.69%; the curve shows that the quality decreased rapidly to 152.2 °C, mainly by evaporation of water.

Conclusions: Cell extract of *C. vulgaris* presents proteins, carbohydrates, phenols and terpenes which can promote the skin cells proliferation and act on tissue repair. The therapeutic efficacy of topical formulations is influenced by active phytoconstituents and vehicular characteristics that play an important role in the control of the drug permeability.

1. Introduction

Bioactive metabolites from microalgae are interesting in the development of new products for medical, pharmaceutical, cosmetic, and food industries (Nascimento-Neto et al, 2012; Kordjazi et al., 2013; Wang et al., 2015). The microalgae *Chlorella vulgaris* had a strong increase in applications in the last years due to their property of producing different bioactive (Nascimento-Neto et al, 2012, Kordjazi et al., 2013, Albaayit et al., 2015). Proteins and enzymes such as nitrate reductase, catalase, lectins, proteases, alkalases (Chu et al., 2006) and secondary metabolites such as flavonoids, saponins, tannins, phenolic compounds and terpenes (Uma et al., 2011; Dantas et al., 2015, Jayshree et al., 2016; Yadavalli et al., 2018) have been reported in *Chlorella* extracts. Some studies with *Chlorella* spp. extract demonstrate several biological activities as antitumor activity (Cha et al., 2008; Ramos et al., 2010), antioxidants (Vijayavel et al., 2007), and wound healing (Melo et al., 2019).

Every year, millions of people suffer skin injuries caused by various factors such as fire, heat, electricity, chemicals, or diseases (Pan et al., 2017). Over the years, new methods for administering medicines are developed in order to overcome limitations of the conventional vehicles or to optimize the administration of these drugs. Many medicaments meant for topical application to intact or broken skin have been presented in the form of semisolid consistency include ointments, cream, emulsions, and gels (Shelke and Mahajan, 2015).

Hydrogel based wound dressings possess all the necessary properties that wound healing requires as maintaining a moist environment at the wound interface, allowing gaseous exchange, maintaining a barrier to microorganisms, biocompatibility and ability to topically deliver several classes of drugs (Gupta and Garg, 2002; Paul et al., 2004; Nho et al., 2014). Thus, a wound dressing acts as a barrier and show rapid wound closure, reducing scar formation is highly required.

Physical and chemical stability of topical formulations must be determined to evaluate quality of product and must be kept constant during the formulation shelf-life. The physical stability of a topical formulation can be evaluated by rheological behavior, structural and morphological parameters. Furthermore, the performance of topical products depends to a great extent on the rheological behavior (Jiao and Burgess 2003; Gianeti et al. 2012).

Bioactives can be as efficient as those produced by chemical synthesis where the transformation of these compounds into a drug must ensure chemical and pharmacological integrity (Toledo et al., 2003). In this way, the use of biomolecules with therapeutic activity and applications in biotechnology obtained from microalgae can be a potential source in the production of healing therapeutic agents. For this, it is necessary to know the molecules responsible for this biological action and to define the possible phytopharmaceuticals which justify its great pharmaceutical and biotechnological potential. There is still a growing interest in studying and understanding how natural products can contribute to this process, with the aim of improving the characteristics

Thus, this work aimed to characterise a topical formulation of cell extract of *Chlorella vulgaris* to activity wound healing.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture conditions

The freshwater microalga *Chlorella vulgaris* (UTEX, 1803) was obtained from the University of Texas culture collection (Austin, TX). *C. vulgaris* was cultivated in Bold's Basal medium (Bischoff and Bold, 1963) supplemented with 1% corn steep liquor (Silva et al., 2017), at 27 ± 1 °C, light intensity of 52 ± 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and aeration constant. After stationary phase of cell growth had been reached, biomass was centrifuged at 340 $\times g$ for 8 min (Sigma Laboratory Centrifuge 6-15, Osterode am Harz, Germany) and lyophilized (SP Scientific BenchTop Pro, Warminster, USA) for subsequent analysis.

2.2 Preparation of the extract

The extracts were prepared according to Chu et al. (2006). The extraction was performed at 50 mg/mL using Tris-HCl-Saline buffer (pH 7.5 at 0.15M), using ice bath sonication (Sonicator Bandelin electronic, Berlin, Germany) in 10 cycles of 1 minute, interval of 1 minute between each pulse. The material was centrifuged (Hermle Labortechnik Centrifuge 326 HK, Wehingen, Germany) at 820 $\times g$ for 7 minutes at 4 °C. The supernatant was used as cell extract for the experimental activities.

2.4 Phytochemical characterization

2.4.1 Phytochemical screening

Phytochemical analysis of the extract was carried out using ethanol chemical solvent. The presence and absence of phytoconstituents such as alkaloids, terpenoids, steroids, tannins, saponins, flavonoids, phenols, coumarins, quinones and glycosides were according on Savithramma et al. (2011).

2.4.2 Determination of total phenolic content

The total phenolic content of *Chlorella vulgaris* extract was determined using a spectrophotometric method (Singleton et al. 1999). A methanolic solution of the extract at 1 mg/mL was used in the analysis. The reaction mixture was prepared mixing 0.5 mL of a methanolic solution of extract, 2.5 mL of 10% Folin–Ciocalteu’s reagent dissolved in water and 2.5 mL of 7.5% sodium bicarbonate. A blank was prepared concomitantly, containing 0.5 mL methanol, 2.5 mL of 10% Folin–Ciocalteu’s reagent dissolved in water and 2.5 mL of 7.5% sodium bicarbonate. The samples were then incubated at 45 °C for 45 min and the absorbance was measured at 765 nm. Quantification was done on the basis of a standard curve of gallic acid. The results were expressed as gallic acid equivalents (mg of GA/g of extract). All samples were analyzed triplicate.

2.5 Proteins characterization

2.5.1 Protein Purification

The cell extract of *C. vulgaris* was precipitated with 60% ammonium sulfate, resuspended in 0.15M Tris-HCl-NaCl buffer pH 7.5 and loaded on anion exchange chromatography using HiTrap™ DEAE FF column (0.7 x 2.5 cm) (AKTA™ avant 25, Uppsala, Sweden). Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min with a linear gradient of 0.0-1 M NaCl in the same buffer. Fractions were monitored and collected at 280 nm.

2.5.2 Protein concentration

The protein content of the samples was determined by the BCA protein assay reagent kit (BCATM Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC). Serum albumin was used as the standard protein.

2.5.3 Analysis of the extract in electrophoresis

SDS-PAGE gel was performed at 12.5% (w/v) according to Laemmli (1970). The protein bands were revealed by silver nitrate. The molecular patterns were: Myosin from

porcine heart (200 kDa), β -Galactosidase from *E. coli* (116 kDa), Phosphorylase b from rabbit muscle (97 kDa), Albumin (66 kDa), Glutamic Dehydrogenase from bovine liver (55 kDa), Ovalbumin from chicken egg (45 kDa), Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from rabbit muscle (36 kDa), Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes (29 kDa) and Trypsinogen from bovine pancreas (24 kDa).

2.5.4 Hemagglutinating activity

The determination of hemagglutinating activity (HA) of purified fractions was performed in microtiter plates described by Correia and Coelho (1995). Extract preparation (50 μ L) were twofold serially diluted with 0.15 M NaCl, followed by the addition of a 50 μ L suspension of bovine erythrocytes, horses erythrocytes or human blood erythrocytes (blood type A, type B, and type O) treated with 2.5% (v/v) glutaraldehyde. After resting for 45 min, HA was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination. Hemagglutination was observed macroscopically and expressed as a titer.

2.6 Cytotoxicity Assay

Human fibroblast cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/mL in a 96-well plate and cultured for 24h in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), at 37 °C, 5% CO₂. The extract was solubilized in the afore mentioned culture medium and filtered using 0.22 μ m membrane (Kasvi, Paraná, Brazil). Different concentrations were tested: 1000 μ g/mL, 500 μ g/mL, 250 μ g/mL, 125 μ g/mL e 62.5 μ g/mL for 48h. After this period, 20 μ L of MTT (5 mg/mL) was added to each well. After 3h of incubation at 37 °C, 5% CO₂ was added 130 μ L in each SDS well (20%). Cell viability was measured by comparing the absorbance in a microplate reader (570 nm) between treated and untreated cells. Analyses were performed in three replicates for each sample. Cell metabolic activity (%) was calculated as follows: $100 \times (\text{ODs}/\text{ODc})$, where ODs is the mean value of the measured optical density of each tested sample and ODc is the mean value of the measured optical density of cells incubated without extract (control). The study was performed in three replicates, using primary human fibroblasts obtained from 3 donors (7th passage).

2.7 Preparation of gel formulation

Carbopol-940 (0.8% w/w) was dissolved in distilled water and stirred until the clear solution was reached. Methylisothiazolinone (0.2% w / w) was slowly added to the above mixture. The formulated gel was kept overnight in a refrigerator to allow swelling. After 24 hours, 25% microalgae extract was added to the carbopol-940 gel with stirring to obtain a

homogeneous mixture. Carbopol-940 gel was neutralized to pH 7.0-7.5 with triethanolamine.

2.8 Gel characterization

2.8.1 Organoleptic evaluation

The gel formulation was inspected for smell, homogeneity, colour and consistency by visual inspection.

2.8.2 pH measurement

The pH of the gel formulation was determined by using a digital pH meter (Quimis Q400AS, Diadema, São Paulo). The measurement of pH of formulation was done in triplicate and average values were calculated.

2.8.3 Viscosity:

The measurement of viscosity was done with a Rheology International viscometer (RI:2: M /H1/H2, California, EUA) with spindle type S7, rotation speed of 10 to 100 rpm with sample volume of 60 mL at temperature 18 ± 0.50 °C. The measurement of viscosity of formulation was done in triplicate and average values were calculated.

2.8.4 Spreadability determination

This procedure was performed, in triplicate, according to Knorst (1991). This method uses a circular mold plate of glass (diameter = 20 cm, width = 0.2 cm) with a central orifice of 1.2 cm diameter, which is placed on a glass support plate (20 cm x 20 cm) positioned over millimetric graph paper.

Each sample was introduced into the orifice of the die plate and the surface leveled with a spatula. The plaque mold was carefully removed and a glass plate of known weight was placed over the sample. After one minute, the diameter in opposing positions (as covered by the sample) was read with the aid of the graph paper scale. Subsequently, we calculated the average diameter. This procedure was repeated successively adding other plates in one-minute intervals. The results were expressed as spreadability of the sample due to the applied weight, according to the equation, which corresponds to the mean of three determinations.

$$E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

where: E_i = spreadability of the sample weight for a given i (cm^2); d = diameter (cm).

2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra of the cell extract, carbopol-940 and formulation were collected on an infrared spectrophotometer (Spectrum 400 PerinElmer[®], Massachusetts, EUA). The IR spectra were obtained in the range of 4000 to 650 cm^{-1} at a resolution ratio of 4 cm^{-1} and the scan number was 16. This procedure was performed in triplicate.

2.10 Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermal stability of the cell extract, carbopol-940 and methylisothiazolinone were evaluated in a thermogravimetric analyzer TGA (DTG-60H, Barueri, São Paulo). The study was carried out under dynamic nitrogen atmosphere (100 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) and heating ratio of 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. 5 ± 0.5 mg of the samples were analyzed over a temperature range of 30 to 600 $^{\circ}\text{C}$.

3. Results and Discussion

3.1 Phytochemical characterization

Different phytochemicals were reported to have biological activities which may help in protection against various diseases. For example, most of the steroids and triterpenoids algal have analgesic properties (Sumayya and Murugan, 2016). Qualitative analysis of the *Chlorella vulgaris* extract demonstrated the presented only terpene. Previous works reports that terpenes has anti-inflammatory (Han, 2005), antifungal (Lasram et al., 2019), antimicrobial activities (Patil and Kumbhar, 2018) and these biological activities contributes to wound healing.

The total phenol contents in the *Chlorella vulgaris* extract was 1.35 ± 0.18 mg/g of GA. This values was lower than reported by Dantas et al. (2015) and Ali and Doumandji (2017) using *Chlorella vulgaris* (3.45 ± 0.26 mg/g) and *Chlorella pyrenoidosa* (106.52 ± 0.25 mg/g) cultivated in phototrophic conditions. This show that the growth conditions as salinity, luminosity and nutrient availability and type of culture, autotrophic or heterotrophic, influence on total phenol contents of *Chlorella* microalgae.

3.2 Protein Characterization

The elution profiles indicated two peaks of protein (Figure 1). The first peak eluted at 0.15 M NaCl and the second eluted at 1.0 M. Only the first peak showed total protein content of 250 ± 0.005 $\mu\text{g/mL}$ and hemagglutinating activity $\geq$ to 2^5 , erythrocyte type B of

the ABO human blood system. Melo et al., 2019 reported the hemagglutinating activity of *C. vulgaris* mixotrophic extract with values of $\geq 2^{48}$ using rabbit erythrocytes and $\geq 2^{24}$ using type B of the ABO human blood system. Many investigators reported different biological roles from lectins, such analgesic activities (Leite et al., 2012), anti-inflammatory (Vanderlei et al., 2010; Araujo et al., 2013), wound healing (Coriliano et al., 2014) and hydrogel formulation from lectins with potential wound healing (Sousa et al., 2019).

The protein the first peak eluted was analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis and revealed a single band with an approximate molecular mass of 36 kDa (Figure 2). Proteins, such as keratin, sericin and lectins, can contribute to wound healing through granulation tissue formation, keratinocyte migration and fibroblast stimulation, with consequent increase in collagen production (Abood et al., 2018; Kamalathevan et al., 2018; Kim et al., 2019; Yang et al., 2019).

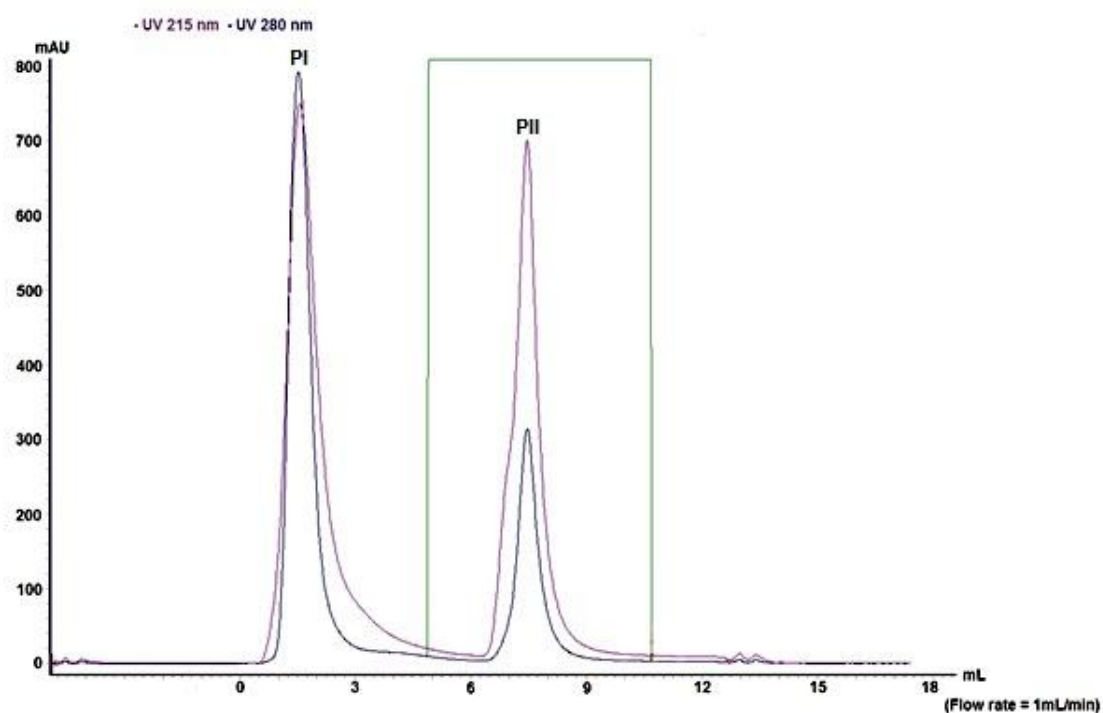


Figure 1. Chromatographic profile of *Chlorella vulgaris* extract applied HiTrap™ DEAE FF column; PI eluted with Tris-HCl pH 7.5 with 0.15 M NaCl; PII eluted with Tris-HCl pH 7.5 with 1 M NaCl.

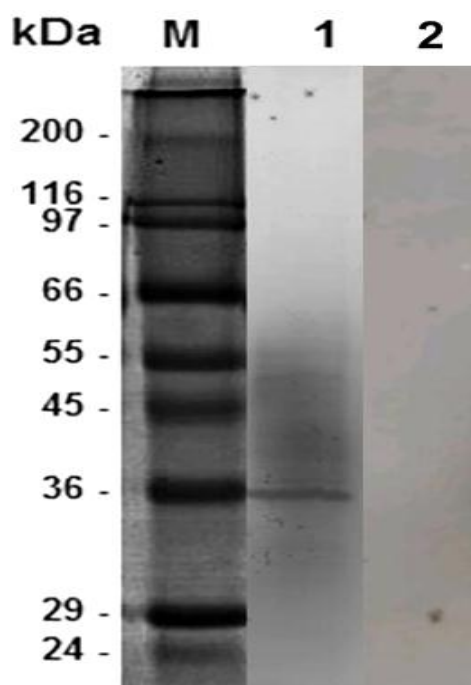


Figure 2. SDS-PAGE analysis of the fractions of purified proteins from *Chlorella vulgaris* extract using DEAE ion-exchange chromatography column. M: Molecular weight marker; 1: Purified 0.15 M NaCl; 2: Purified 1.0 M NaCl.

3.3 Cytotoxicity Assay

Though *Chlorella vulgaris* is approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as GRAS (Generally Recognized as Safe), *C. vulgaris* extract was tested *in vitro* on fibroblast cell at different concentrations to identify the non-toxic concentration. The extract showed cytocompatibility with proliferative effect on human fibroblast culture after 48 hours of treatment (Figure 3).

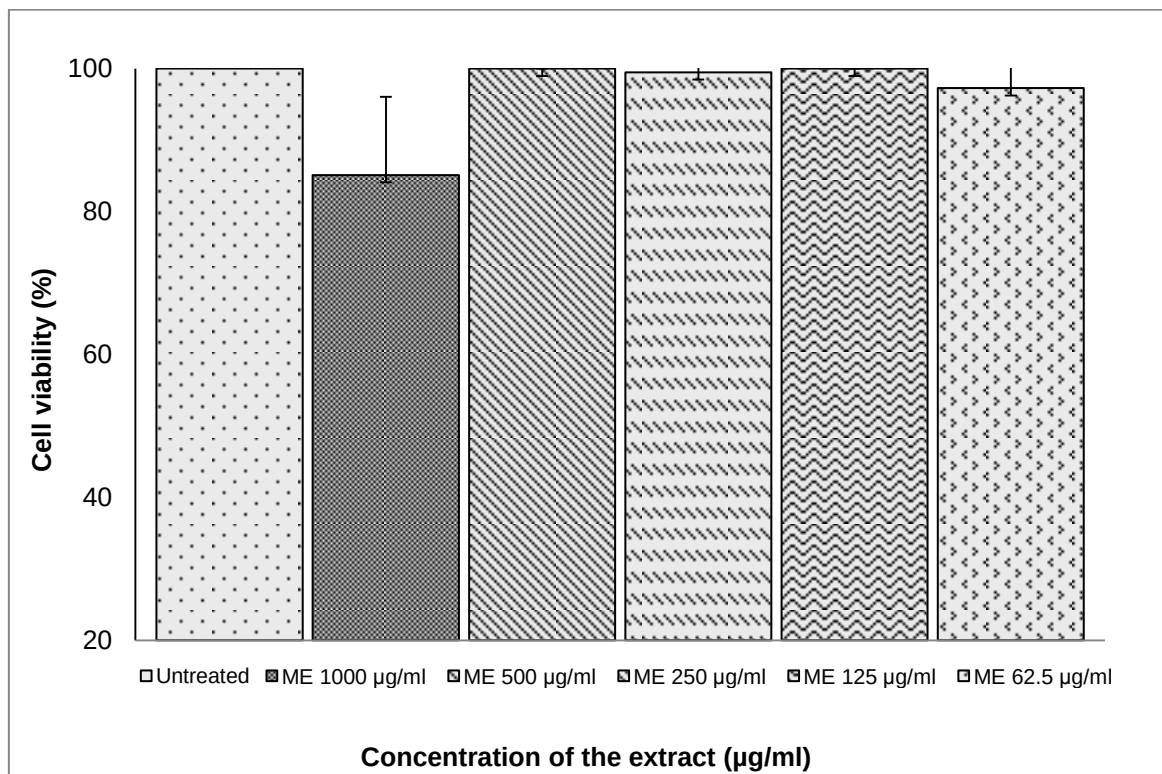


Figure 3. Percentage cell viability of various concentrations of *Chlorella vulgaris* microalgae extract and the control group (DMEN) on fibroblast cells. Each value represents the mean and SD of 3 experiments.

Over the years, different natural products have been used for therapeutic purposes. With a focus on bioproducts, microalgae represent a promising and natural source for the production of biochemically active substances such as proteins, pigments, lipids and other compounds. Metabolite variations are related to the diversity of defense mechanisms that result in a variety of compounds produced by various metabolic pathways, resulting in several beneficial biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and immunomodulatory (Qi and Kim, 2016; Vaz et al., 2016; Bari et al., 2017).

The terpenes and lectins in the *C. vulgaris* extract are described as antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory agents. The synergistic effects of these compounds may aid in healing activity. There are few documented studies using microalgae for wound healing, and the lack of studies does not provide sufficient support to understand the mechanism of activity of this extract.

3.4 Gel characteristics

Macroscopic characteristics of the gel formulation showed green color, a smooth texture, slightly turbid and homogeneous and characteristic odor of microalgae extract.

As the physiological pH of the open wounds is 7.1 to 7.3, it is required that the pH value of preparation should remain in this range (Dandasi et al., 2020). The gel showed pH values of 7.09 ± 0.07 . No any skin irritation in mice was observed due to gel application for twelve days of study (Melo et al., 2019).

Spreadability, which is an important characteristic of the topical dosage form, is carried out to describe the spread and distribution of gel when applied to the skin. The bioavailability efficacy of the gel depends on its ability to spread (Garg et al., 2002; Saryanti and Zulfa, 2017). The spreadability of the formulation was considered high by having a higher spread in short time (Figure 4). Spreadability was in the range of 14.18 to 28.73 gm.cm/sec. These results indicate that the spreadability achieved leaves a thinner film on the skin. In other words, less force will be required to spread the product in inflamed, hairy or oily areas, such chronics injuread.

The spreading high helps in the uniform application of the formulation to the skin, so the prepared gels must satisfy the optimal quality in topical application. The therapeutic efficacy of active principle depends on their spread of the gel. Furthermore, this is considered an important factor in patient compliance with treatment. Therefore, the determination of spreadability factor is an important parameter for the semisolid development intended to skin application once it is performed to verify if the semisolids would present ease of application (Garg et al., 2002).

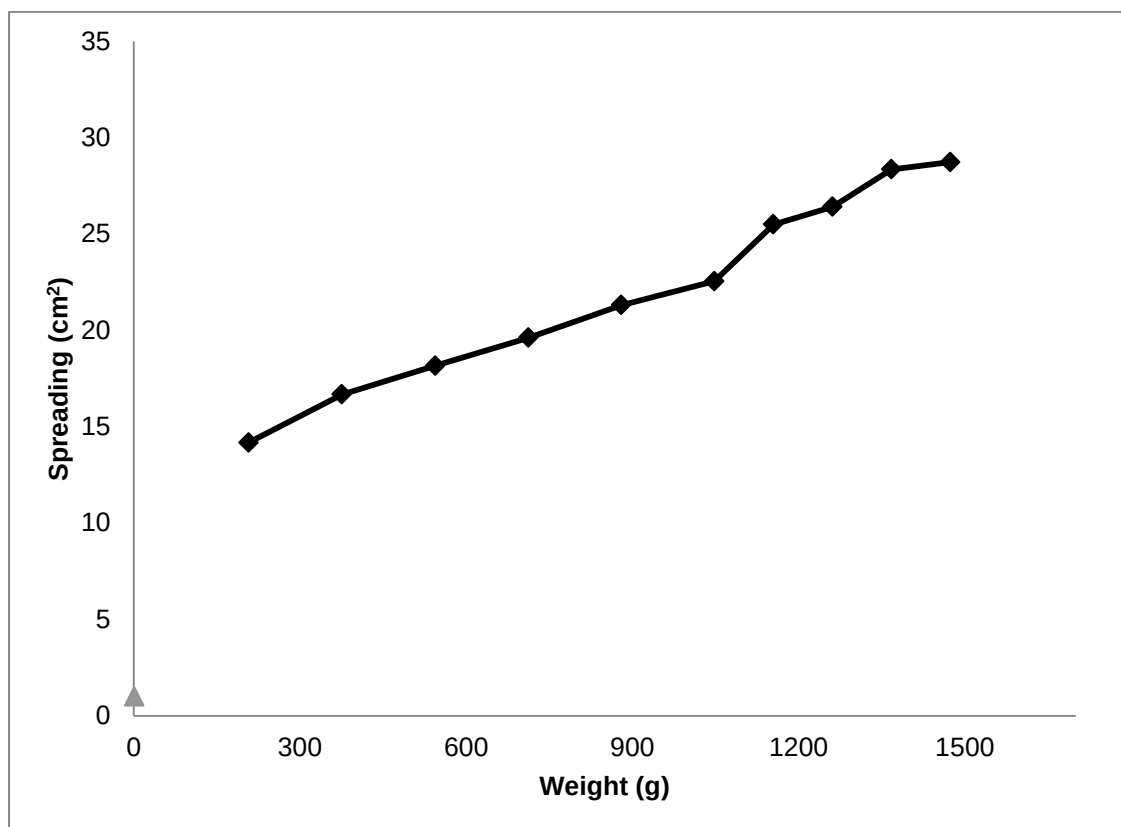


Figure 4. Determination of the spreadability of the gel formulation.

Besides the spreadability evaluation, rheological behavior is another fundamental assessment in the scope of semisolid characterization. Rheological tests were performed to evaluate how microalgae extract influences the viscosity behavior of the carbopol vehicle. Figure 5 shows the behavior the formulation which had viscosity tested at ten times with 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 rpm. In respect to the rheological evaluation, the formulation presented non-Newtonian pseudoplastic flow, characteristic of solutions of gelling agents and semisolids (Aulton, 2005; Rathod and Mehta, 2015). Furthermore, this gel was characterized by thixotropy. This flow behavior presented by the semisolids is desirable, as it means that the gel formulation can easily flow and spread in the applied area. If the formulation spreads easily, not much force is required to its application, an important favorable characteristic in the development of formulations intended to treat injured areas. This result is clinically relevant once the pain is a symptom frequently associated with injured areas (Rigo et al., 2015).

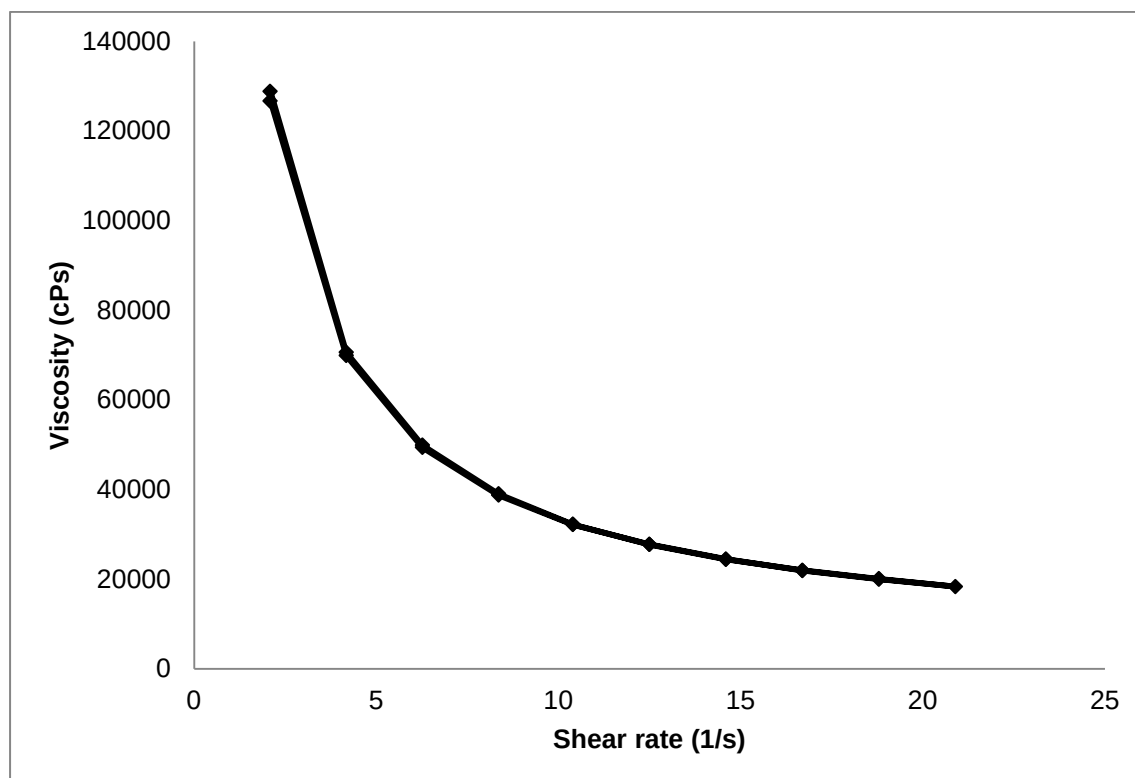


Figure 5. Effect of shear rate on the viscosity of formulation gel.

The consistency the gel is one of the most important features for topical analgesic and anti-inflammatory formulations due to being applied to the thin layers of the skin, so that the hydrogel viscosity plays an important role in controlling of drug permeation. The efficacy of topical therapy is conditioned to the spreading of the medicine on a uniform layer on the damaged skin to guarantee a standard dose of the active compound. Furthermore, a formulation developed to treat injuries cannot require too much force to spread once these damaged areas are often also painful and sensitive (Garg et al., 2002).

Worldwide, there is a constant interest in the development of new topical products, like gels and creams, intended for the treatment of wound (Pegoraro et al., 2019). Hydrogels should exhibit basic features, such as swelling capacity, drug compatibility, safety, low toxicity, shelf stability and high purity; other requirements include biocompatibility, biodegradability, mechanical strength and multiple biofunctionalities. For tissue engineering, hydrogel biodegradability is essential as they invariably function as temporary extracellular matrix until replaced by new tissue, while bioactivity is essential for guiding cell behavior, such as proliferation, differentiation and matrix production (Jin and Dijkstra, 2010).

3.5 FTIR spectroscopy

In Figure 6 FT-IR spectrum of the extract of *Chlorella vulgaris* at 3187 cm^{-1} indicates the presence of OH stretching, indicates carboxylic acids. The extract displayed absorption bands in the region of 2954 cm^{-1} due to C-H stretching vibration, indicates terpenes (Majunder et al., 2009). The band 1629 cm^{-1} is assigned to amine stretching (Yokoi et al., 1998). The observed sharp peak at 1553 cm^{-1} for N-O stretching. The peak at 1401 cm^{-1} was the joint contribution of the vibration of OH and C-H (Qian et al., 2006). Other peak at 1295 cm^{-1} C-N stretching, indicates the presence of Aromatic amines. The extract showed band related to the stretching vibration of carbohydrates in the region at 1035 cm^{-1} (Bremer and Geesey, 1991; Bramhachari and Dubey, 2006).

C. vulgaris contains several carbohydrates, including β -1,3 glucan, a modifier of the response biological with activity immunostimulator and a free-radical scavenger (Wang et al., 2010). Studies report the ability of β -1,3-glucan to activate the innate immunity response with effects also on adaptive immunity, inducing humoral immune responses, increasing the antimicrobial activity of mononuclear and neutrophil cells (Wakshull et al., 1999) and macrophage response (Chanput et al., 2012). According to the results of the FTIR analysis, *C. vulgaris* cell extract composition may be correlation with the healing activity.

FTIR analysis was used to test for any chemical or physical interactions between: cell extract and carbopol hydrogel. Figure 6 presents the spectra of cell extract, formulation and of gel before mixing (extract and carbopol hydrogel).

The carbopol hydrogel consists of Carbopol®940, methylisothiazolinone, purified water, and triethanolamine. This composition is responsible for the following characteristic peaks in the carbopol hydrogel spectrum: the peak located at 3332 and 3334 cm^{-1} is associated (–OH) free hydroxyl group; the (C=O) carbonyl group can be determined 1637 and 1638 cm^{-1} . All three peaks are clearly visible in the spectra of formulation. These results are suggestive of a lack of chemical interaction between the cell extract and carbopol hydrogel, as well as the existence of a physical mixture of the two phases (Singh et al., 2014).

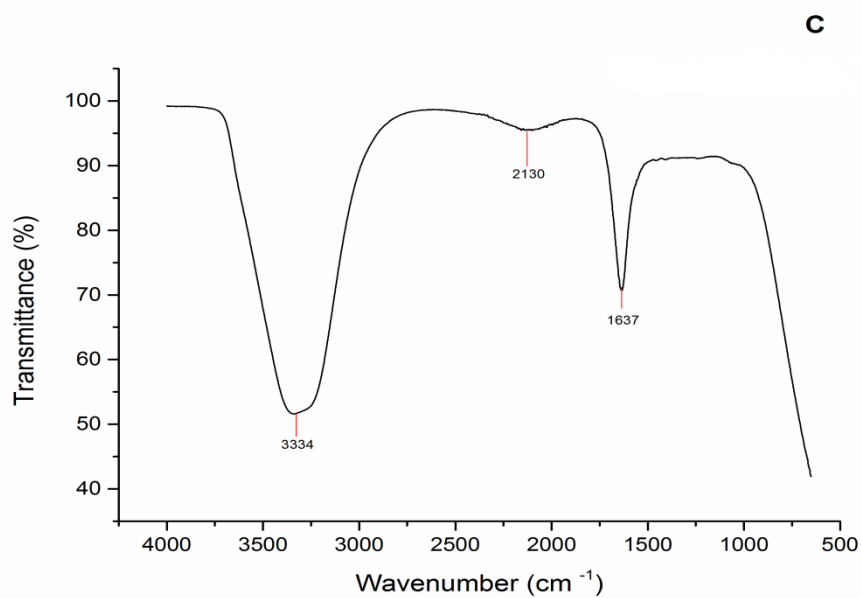
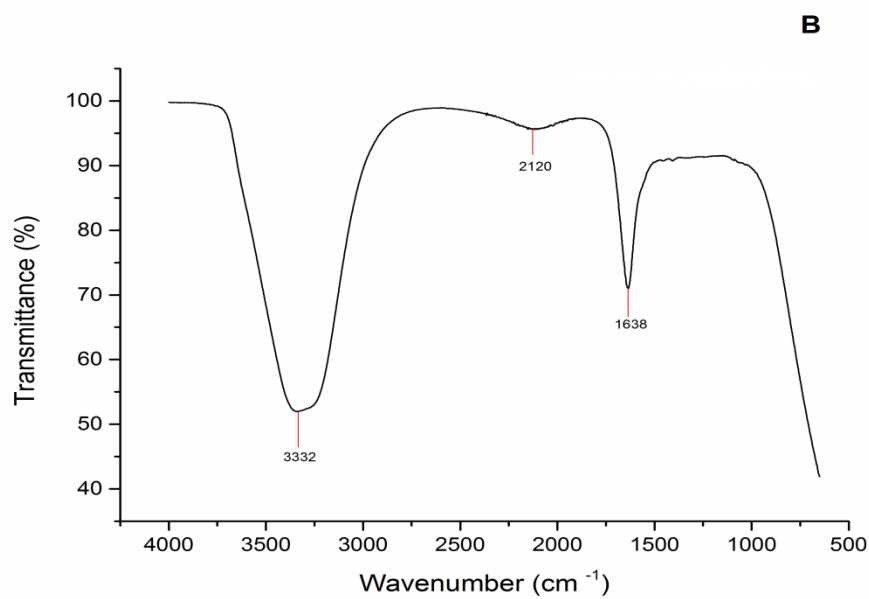
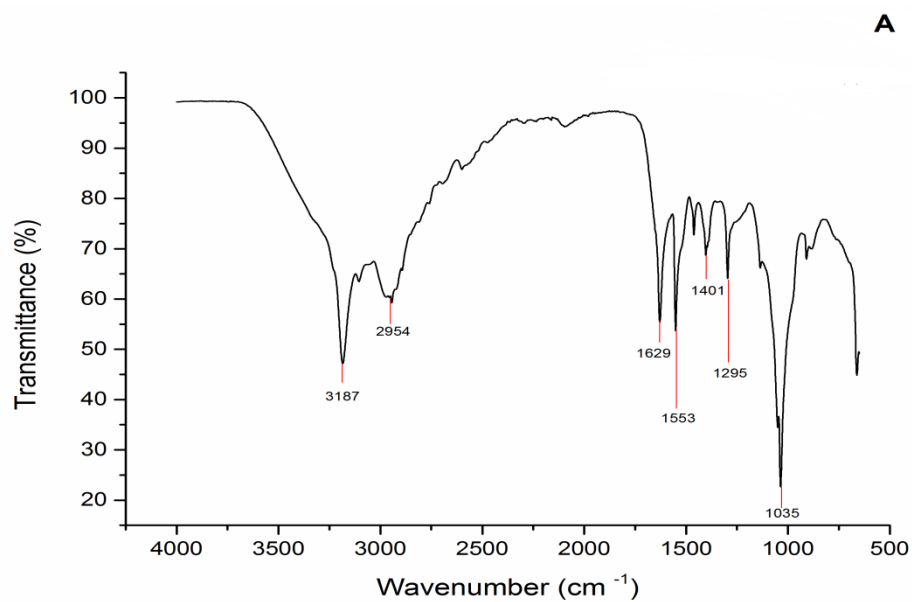


Figure 6. Fourier transform infrared spectrum: A – Extract of *Chlorella vulgaris*, B – Carbopol-940, C – Formulation.

3.6 Thermogravimetric Analysis

Figure 7 shows the TGA diagram of the cell extract, methylisothiazolinone and carbopol-940. According to the TGA curve, the final mass loss percentage of the cell extract was 23.56%, occurred at 218.64 °C. Carbopol-940 has mass loss of 19.39%, occurred at 301.62%. Mass loss in between Carbopol-940 and cell extract was 9.07%, occurred at 191.52 °C. Carbopol-940 and cell extract showed similar thermal degradation behavior. The mass loss of the methylisothiazolinone was 94.69%; the curve shows that the quality decreased rapidly up to 152.2 °C, mainly via evaporation of water. Until 128,52 °C, mass loss is noticeable in between cell extract and methylisothiazolinone, this shows that significant amount of moisture exists.

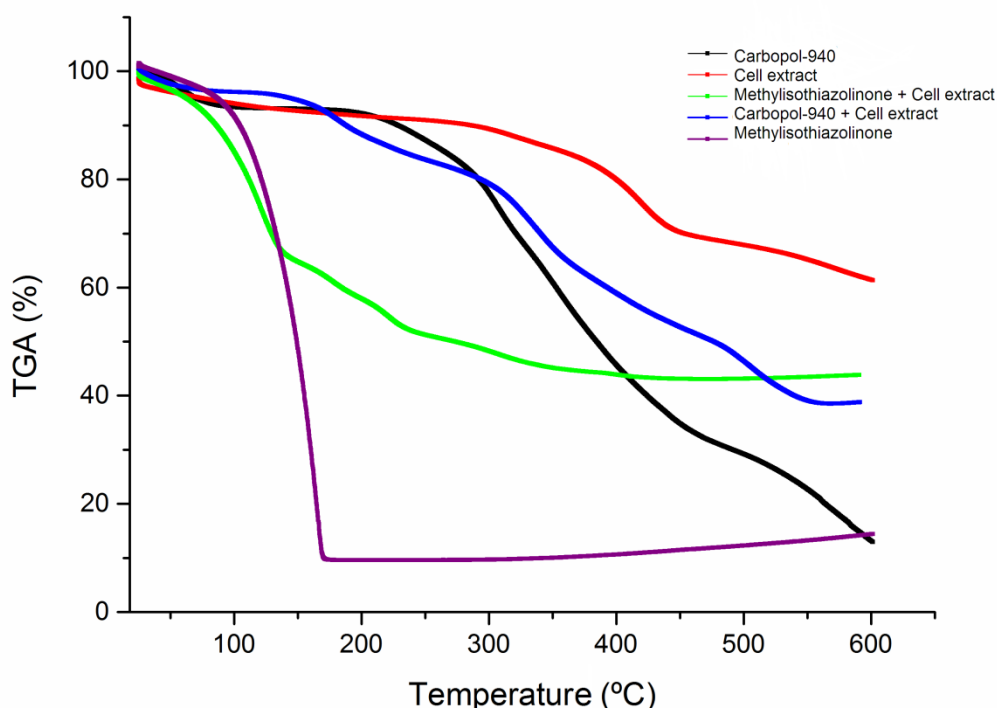


Figure 7. TGA of extract, methylisothiazolinone and carbopol-940.

Since the proposed formulation system is intended to be used for the release of drug from the varying medium or as a booster for use as a biomaterial, and the release process is normally carried out at physiological temperature 37 °C, the polymer is totally stable in the vicinity of room temperature which normally varies between 27 and 38 °C.

4. Conclusions

Chlorella vulgaris extract contains a mixture of proteins, carbohydrates and terpenes that can have a synergistic effect on skin cell proliferation, wound healing and tissue regeneration. According to the results obtained from this study, it was concluded that the *Chlorella vulgaris* extract was successfully incorporated into the carbopol to obtain a formulation. The formulation showed smooth texture, viscosity and spreadability that are appropriate for semi-solid formulations. The formulation show pH would not produce skin irritation. Thermal stability around 120 °C, it is important to know its properties and understand its fragilities considering extreme operating temperatures.

The therapeutic efficacy of the topical formulations is influenced by active phytoconstituents and vehicle characteristics that play an important role in controlling of drug permeation. The knowledge of the chemical composition of the different extracts is necessary, since the active biomolecules coming from these photosynthetic microorganisms become a potential alternative for the treatment of diseases, presenting high availability and low toxicity.

Acknowledgment

The authors acknowledge the financial support of the Foundation of Support for Science and Technology of PE (FACEPE) - Brazil.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- ABOOD A, SALMAN AMM, ABDELFAHATTAH AM, EL-HAKIM AE, ABDEL-ATY AM, HASHEM AM. 2018. Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza and its application in wound healing. *Int J Biol Macromol*, v.116, p.801–8110.
- ALBAAYIT, SFA; ABBA, Y; RASEDEE, A; ABDULLAH, N. 2015. Effect of *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae) leaf extract on wound healing and antioxidant activity in rats. *Drug Design, Development and Therapy*, v.9, p.3507–3518.
- ALI, IH; DOUMANDJI, A. 2017. Analyse phytochimique comparative et étude *in vitro* des activités antimicrobiennes de la cyanobactérie *Spirulina platensis* et de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* : application potentielle des composants bioactifs comme alternative aux maladies infectieuses. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie*, v.39, p.41-49.
- ARAUJO, LCC; AGUIAR, JS; NAPOLEAO, TH; MOTA, FVB; BARROS, ALS; MOURA, MC; CORIOLANO, MC; COELHO, LCBB.; SILVA, TG; PAIVA, PMG. 2013. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds, *PLoS ONE*, v.8, p.81973.
- AULTON, ME. 2005. *Delineamento de formas farmacêuticas*, 2nd edn. Porto Alegre, Artmed
- BARI, E; ARCIOLA, CR; VIGANI, B; CRIVELLI, B; MORO, P; MARRUBINI, G; SORRENTI, M; CATENACCI, L; BRUNI, G; CHLAPANIDAS, T; LUCARELLI, E; PERTEGHELLA, S; TORRE, ML.

2017. *In Vitro* Effectiveness of Microspheres Based on Silk Sericin and *Chlorella vulgaris* or *Arthrospira platensis* for Wound Healing Applications. *Materials*, v.10, p.983.
- BISCHOFF, HW; BOLD, HC. 1963. Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species. University of Texas Publications number, v.6318, p.1-95.
- BOTELHO, D; WALL, MJ; VIEIRA, DB; FITZSIMMONS, S; LIU, F; DOUCETTE, A. 2009. Top-Down and Bottom-Up Proteomics of SDS-Containing Solutions Following Mass-Based Separation, *J. Proteome Res.*, v.9, p.2863-2870.
- BRAMHACHARI, PV; DUBEY, SK. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.43, 571–577.
- BREMER, PJ; GEESEY, GG. 1991. An evaluation of biofilms development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling*, v.3, p.89–100.
- CHANPUT W, REITSMA M, KLEINJANS L, MES JJ, SAVELKOUL HF, WICHERS HJ. β -glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56:822–833.
- CHU, CY; HUANG, R; LIN, LP. 2006. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.33, p.967–973.
- CORRIOLANO, MC; MELO, CML; SILVA, FO; SCHIRATO, GV; PORTO, CS; SANTOS, PJP; CORREIA, MTS; PORTO, ALF; CARNEIRO-LEAO, AMA; COELHO, LCBB. 2014. *Parkia pendula* seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immune compromised mice, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.172, p.2682-2693,
- CORREIA, MTS; COELHO, LCBB. 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart (Camaratu Bean). *Appl Biochem Biotechnol* v.55, p.261–273.
- DANTAS, DMM; COSTA, RMPB; CARNEIRO-DA-CUNHA, MG; GALVEZ, AO; DRUMMOND, AR; BEZERRA, RS. 2015. Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from *Chlorella vulgaris*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, v.4.
- DANDASI, JCD; JAYAPRAKASH, JS; KULKARNI, PK; AKHILA, AR; NAMRATHA, S. 2020. Formulation and evaluation of different topical dosage forms for wound healing properties. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, v.11, p.730-746.
- GARG A, AGGARWAL D, GARG S, SINGLA AK. 2002. Spreading of semisolid formulations: an update. *Pharm Technol.* v.26, p.84–105.
- GIANETI MD, GASPAR LR, DE CAMARGO FBJ, CAMPOS PMBGM. 2012. Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. *Molecules*. 17:2219–2230.
- GIL-CHÀVEZ, G.J.; VILLA, J.A.; AYALA-ZAVALA, F.; HEREDIA, B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E.M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. 2013. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.12, p.5–23.
- GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. 2002. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov. Today*, v.7, p.569–579.
- GUPTA P, GARG S. 2002. Recent advances in semisolid dosage forms for dermatological application. *Pharm Technol.* v.26, p.144–62.
- HAN, Y. 2005. *Ginkgo* terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. *International Immunopharmacology*, v.5, p.1049-1056.
- JAYSHREE, A; JAYASHREE, S; THANGARAJU, N. 2016. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. *Indian J. Pharmaceut Sci.*, v.78, p.575–81.
- JIN, R; DIJKSTRA, PJ. 2010. Hydrogels for tissue engineering applications, in: R.M. Ottenbrite, K. Park, T. Okano (Eds.), *Biomed. Appl. Hydrogels Handb.* Springer International Publishing, New York, p. 215–225
- KAMALATHEVAN P; OOI P; LOO TL. 2018. Silk-based biomaterials in cutaneous wound healing: a systematic review. *Adv Skin Wound Care*, v.31, p.565–573.
- KIM SY, PARK BJ, LEE Y, PARK NJ, PARK KM, HWANG Y, PARK KD. 2019. Human hair keratin-based hydrogels as dynamic matrices for facilitating wound healing. *J Indust Eng Chem*, v.73, p.142–151.

- KORDJAZI, M; SHABANPOUR, B; ZABIHI, E; FARAMARZI, MA; FEIZI, F; GAVLIGHI, HA. 2013. Sulfated Polysaccharides Purified from Two Species of *Padina* Improve Collagen and Epidermis Formation in the Rat. *Int J Mol Cell Med Autumn*, v. 2, p.157.
- JIAO J, BURGESS D. 2003. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS PharmSci*. v.5, p.62–73.
- LAEMMLI, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v.227, p.680-685.
- LASRAM, S; ZEMNI, H; HAMDI, Z; CHENENAOUI, S; HOUISSA, H; TOUNSI, MS; GHORBEL, A. 2019. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, v.134, p.11-18.
- LEITE, JFM; ASSREUY, AMS; MOTA, MRL; BRINGEL, PHSF; LACERDA, RR; GOMES, VM; CAJAZEIRAS, JB; NASCIMENTO, KS; PESSOA, HLF; GADELHA, CAA; DELATORRE, P; CAVADA, BS; SANTI-GADELHA, T. 2012. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. *Molecules*, v.17, p.3277-3290
- Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and biomarkers for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2016; 138 (Suppl. 3): 18S-28S.
- MAJUNDER, A; SINGH, A; GOYAL, A. 2009. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization, *Carbohydr. Polym*, v.75, p.150–156.
- MELO, RG; ANDRADE, AF; BEZERRA, RP; MARQUES, DAV; SILVA, VA; PAZ, ST; LIMA-FILHO, JL.; PORTO, ALF. 2019. Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. v.31, p. 1-11.
- MORAIS, M.G.; VAZ BDA, S.; MORAIS, E.G.; COSTA, J.A. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Research International*.
- NASCIMENTO-NETO, LG; CARNEIRO, R.F; SILVA, SR; SILVA, BR; ARRUDA, FVS; NAGANO, CS. 2012. Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. *Marine Drugs*, v.10, p.1936-1954.
- Nho, Y.C.; Park, J.S.; Lim, Y.M. Preparation of hydrogel by radiation for the healing of diabetic ulcer. *Radiat. Phys. Chem.* 2014, 94, 176–180.
- PATIL, SP; KUMBHAR, ST. 2018. Evaluation of terpene-rich extract of *Lantana camara* L. leaves for antimicrobial activity against mycobacteria using Resazurin Microtiter Assay (REMA), v.7, p. 511-515.
- PAUL,W.; SHARMA, P.C. Chitosan and alginate wound dressings—A short review. *Trends Biomater. Artif. Organs* 2004, 18, 18–23.
- PEGORARO, NS; CAMPONOVARA, C; GEHRCE, M; GIULIANI, LM; SILVA, DT; MAURER, LH; DIAS, P; EMANUELLI, T; CRUZ, L; OLIVEIRA, SM. 2019. Oleic acid-containing semisolid dosage forms exhibit *in vivo* anti-inflammatory effect via glucocorticoid receptor in a UVB radiation-induced skin inflammation model. *Inflammopharmacology*.
- QI, J; KIM, SM. 2016. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Int J Biol Macromol*, v.9, p.106–114.
- Qian, F., Cui, F., Ding, J., Tang, C., & Yin, C. (2006). Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: Preparation and characterization. *Biomacromolecules*, 7, 2722–2727
- RAMOS AL, TORELLO CO, QUEIROZ ML. 2010. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutr Cancer*, v.62, p.1170–1180.
- RATHOD HJ, MEHTA DP. 2015. A review on pharmaceutical gel. *Int J Pharm Sci*. v.1, p.33–47.
- RIGO LA, DA SILVA CR, DE OLIVEIRA SM et al. 2015. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Eur J Pharm Biopharm*. v.93, p.11–17.

- SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.Y.; VACA-GARCIA, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.35, p.265–278.
- SAVITHRAMMA, N; RAO, ML; RUKMINI, K; DEVI, PS. 2011. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of Chem Tech Research*, v.3, p. 1394-1402.
- SILVA, PEC; SOUZA, FAZ; BARROS, RC; VIANA-MARQUES, DA; PORTO, ALF; BEZERRA, RP. 2017. Enhanced production of fibrinolytic protease from microalgae *Chlorella vulgaris* using glycerol and corn steep liquor as nutrient. *J. Microbiol. Res*, v.1, p.9-19.
- Singh VK, Anis A, Banerjee I, Pramanik K, Bhattacharya MK, Pal K. Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 44: 151–158.
- SINGH H, ALI SS, KHAN NA, MISHRA A, MISHRA AK. 2017. Wound healing potential of *Cleome viscosa* Linn. Seeds extract and isolation of active constituent. *S Afr J Bot*, v.112, p.460–465.
- SINGLETON, VL; ORTHOFER, R; LAMUELA-RAVENTOS, RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, v.299, p.152-178.
- SOUSA, FD; VASCONSELOS, PD; SILVA, AFB; MOTA, EF; TOMÉ, AR; MENDES, FRS; GOMES, AMM; ABRAHAM, DJ; SHIWEN, X; OWEN, JS; LOURENZONI, MR. 2019. Hydrogel and membrane scaffold formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.121, p.429–442.
- SHELKE U, MAHAJAN AA. Review on: An ointment. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 2015; 4(2): 170-192.
- STANKOVIC, MS. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science*, v. 33, p. 63-72.
- TOLEDO, ACO; HIRATA, LL; BUFFON, MCM; MIGUEL, MD; MIGUEL, OG. 2003. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica, *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v.21, n.1/2, p.7-13.
- UMA R; SIVASUBRAMANIAN, V; NIRANJALI DEVARAJ, S. 2011. Preliminary phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial screening of green microalgae, *Desmococcus olivaceus*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *J. Algal Biomass Utiln*, v.2, p.74-81.
- VANDERLEI, ESO; PATOILLO, KKNR; LIMA, NA; LIMA, APS; RODRIGUES, JAG; SILVA, LMCM; LIMA, MEP; LIMA, V; BENEVIDES, NMB. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*, *Int. Immunopharmacol*. v.10, p.1113-1118.
- VAZ, BS; MOREIRA, JB; MORAIS, MG; COSTA, JAV. 2016. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Curr Opin Food Sci*, v.7, p.73–77.
- WAKSHULL E, BRUNKE-REESE D, LINDERMUTH J, FISETTE L, NATHANS RS, CROWLEY JJ, TUFTS JC, ZIMMERMAN J, MACKIN W, ADAMS DS. PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology*. 1999;41:89–107.
- WANG, HM; PAN, JL; CHEN, CY; CHIU, CC; YANG, MH; CHANG, HW; CHANG, JS. 2010. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Proc Biochem*. v.45, p.1865–1872.
- WANG, H.M.; CHEN, C.C.; HUYNH, P.; CHANG, J.S. 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, v.184, p.355–362.
- YADAVALLI, R; PEASARI, JR; MAMINDLA, P; PRAVEENKUMAR MOUNIKA, S., GANUGAPATI, J. 2018. Phytochemical screening and *in silico* studies of flavonoids from *Chlorella pyrenoidosa*. *Informatics in Medicine Unlocked*, v.10, p.89–99.
- YANG Y, SUN Y, ZHANG N, LI J, ZHANG C, DUAN X, DING Y, ZHAO R, ZHENG Z, GENG D, SUN Y. 2019. The up-regulation of two identified wound healing specific proteins-HSP70 and lysozyme in regenerated *Eisenia fetida* through transcriptome analysis. *J Ethnopharmacol*, v.237, p.64–73.

YOKOI, H; ARATAKE, T; HIROSE, J; HAYASHI, S; TAKASAKI, Y. 1998. Chitosan production from shochu distillery wastewater by Funguses. J. Ferment. Bioeng., v.85, p.246-249.

ZARIN MA, WAN HY, ISHA A, ARMANIA N. 2016. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. Food Sci Human Wellness, v.5, p.65–75.

7. Considerações Finais

Com base no conhecimento alcançado sobre a composição do extrato celular da microalga, dentre os metabólitos foi verificada a presença de terpenos, fenóis totais, proteínas e carboidratos, os quais promovem a proliferação de células da pele e atuam no reparo tecidual. Dentre as proteínas observou-se a presença de lectinas, relatadas por diferentes papéis biológicos, como atividade analgésica e cicatrizante. A partir do extrato celular foram preparadas formulações com tipo de base gel, em que se mostrou pH compatível com a pele, os resultados da espalhabilidade e viscosidade indicaram a capacidade de fluir facilmente e se espalhar sobre a área aplicada. O estudo da formulação tem um papel importante no controle da permeabilidade do princípio ativo e os constituintes químicos influenciam na eficácia terapêutica. As biomoléculas ativas provenientes destes microrganismos fotossintetizantes tornam-se uma alternativa potencial para o tratamento de doenças, apresentando alta disponibilidade e baixa toxicidade.

10. Anexos

Cursos realizados

Curso de Qualificação em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica. (Carga horária: 100h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

Participação em eventos

XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2018. Avaliador de trabalho científico.

Resumos publicados em anais de congresso

EGITO, M.S.; **ANDRADE, A.F.**; MELO, R.G.; BEZERRA, R.O.; PORTO, A.L.F.; COSTA, R.M.P.B. 2018. Fitoquímicos presentes em extratos aquosos de *Chlorella* spp: Uma revisão sistemática da literatura. V Jornada Pernambucana de Plantas Medicinais e Fitoterapia. Anais – Resumo Científico.

Resumos completos publicados em anais de congresso

AMORIM, A.P; MOURA, Y. A. S.; SILVA, M. L.; FERREIRA, P.N.; EGITO, M.S.; **ANDRADE, A.F.**; PORTO, A.L.F.; BEZERRA, R.P. 2019. Antimicrobial activity of extracts from *Arthrospira platensis* supplemented with cheese obtained by two different methods. 1º Brasil-France Symposium on Medicinal Chemistry.

FERREIRA, M.P.N.; EGITO, M.S.; **ANDRADE, A.F.**; MELO, R.G.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L.F.; COSTA, R.M.P.B. 2019. Extração de óleos a partir da biomassa de microalgas por dois métodos diferentes: uma breve revisão. II Curso de Inverno em Biociências.

FERREIRA, M.P.N.; EGITO, M.S.; **ANDRADE, A.F.**; MELO, R.G.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L.F.; COSTA, R.M.P.B. 2019. Proteínas Bioativas extraídas de *Chlorella* spp.: uma breve revisão. II Curso de Inverno em Biociências.

AMORIM, A.P.; SILVA, G.H.; **ANDRADE, A.F.**; BEZERRA, R.P. 2019. Peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina produzidos por algas: uma breve revisão. II Curso de Inverno em Biociências.

Artigos publicados

WANDERLEY, M.C.A.; DUARTE-NETO, J.M.W.; **ANDRADE, A.F.**; MELO, R.G.; VIANA-MARQUES, D.A.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L.F. 2020. First report on *Chlorella vulgaris* collagenase production and purification by aqueous two-phase system. Sustainable Chemistry and Pharmacy. v. 15, p. 1-7.

MELO, R.G.; **ANDRADE, A.F.**; BEZERRA, R.P.; CORREIA, D.S.; SOUZA, V.C.; BRADILEIRO-VIDAL, A.C.; MARQUES, D.A.V.; PORTO, A.L.F. 2018. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agroindustrial by-products. Chemosphere. v.204, p.344-350.

MELO, R.G.; **ANDRADE, A.F.**; BEZERRA, R.P.; MARQUES, D.A.V.; SILVA, V.A.; PAZ, S.T.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. 2019. Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. v.31, p. 1-11.

Patentes depositadas

Formulação tópica em gel com atividade cicatrizante contendo extrato de microalga. ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; RAQUEL PEDROSA BEZERRA; DANIELA DE ARAUJO VIANA MARQUES; **ALEXSANDRA FRAZAO DE ANDRADE**; REBECA GONCALVES DE MELO; POLYANNA NUNES HERCULANO; VALDEMIRO AMARO DA SILVA JUNIOR; MARIA HELENA MADRUGA LIMA RIBEIRO; JOSE LUIZ DE LIMA FILHO; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA. Número do depósito ou número do protocolo: 870180168045. Tipo do depósito: (PI, UM, DI etc): PI. Data do depósito: 27/12/18. Escritório (INPI, EPO etc.): INPI.

Patentes em andamento:

Formulação tópica em creme com atividade cicatrizante contendo ácidos graxos de microalga. RAQUEL PEDROSA BEZERRA; **ALEXSANDRA FRAZAO DE ANDRADE**; MILLENA PATRICIO FERREIRA; MICALEYDE SOARES EGITO; REBECA GONCALVES DE MELO; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; DANIELA DE ARAUJO VIANA MARQUES.