



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOYCE DE PONTES GOMES

**Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído da
pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Fortaleza

2021

JOYCE DE PONTES GOMES

Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia dos Produtos Naturais.

Orientador: Professor Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Co-orientador: Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

Fortaleza

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G614d Gomes, Joyce de Pontes.
Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) / Joyce de Pontes Gomes. – 2021.
75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

1. Pele de tilápia. 2. Colágeno. 3. Cicatrização. 4. Estabilidade. I. Título.

CDD 615.1

JOYCE DE PONTES GOMES

DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE HIDROGEL À BASE DE COLÁGENO EXTRAÍDO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia dos Produtos Naturais.

Aprovada em 16 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Dr. Carlos Roberto Koscky Paier (Coorientador)

Universidade Federal do Ceará

Prof.^a Dr.^a Tamara Gonçalves de Araújo

Universidade Federal do Ceará

Dr.^a Taiana Magalhães Pierdoná Martins

University of Manitoba

À minha mãe, Vânia, à minha irmã, Jéssica e ao meu tio, Francisco José, que sempre me incentivaram em tudo e são o meu suporte na minha caminhada na área da ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é Aquele que me sustentou desde o meu primeiro sinal de vida e quem sempre me presenteia com tantas maravilhas diariamente.

À minha família, que me deu todo o suporte possível para que eu busque me desenvolver e me realizar nos meus objetivos.

Aos meus amigos, que trazem um brilho muito especial à minha vida, deixando leve os fardos que carregamos todos os dias.

A todo o corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela disposição em ajudar, pela paciência e por compartilharem comigo uma bagagem de conhecimentos tão rica. Sou grata a Deus por ter aprendido tanto aqui!

À CAPES, por ter financiado durante todos esses meses o meu estudo e por ter mantido a bolsa no período da pandemia de COVID-19.

Ao meu orientador, Professor Odorico, que nunca desistiu de mim, sempre foi cuidadoso em tudo, que utiliza a própria experiência de vida para nos impulsionar nesta carreira tão brilhante que é a científica! Me inspiro muito neste exemplo de determinação, inteligência e confiança que o meu orientador me transmite.

Ao meu co-orientador, Carlos Paier, por ter sido a minha companhia diária nos meus experimentos, sempre me fornecendo ideias novas e me ensinando o que for possível para que o meu projeto vá adiante.

A todos os membros do laboratório, por multiplicarmos as alegrias da nossa rotina de trabalho, descobertas, histórias, comidinhas gostosas no almoço e por dividirmos os fardos, de modo que se tornem pesos leves do cotidiano. Obrigada pela paciência e pelo carinho!

“Peça a Deus que abençoe os seus planos,
e eles darão certo”. Provérbios 16, 3.

RESUMO

O processo de envelhecimento proporciona maior fragilidade à pele e, deste modo, o surgimento de feridas. A hipertensão venosa de membros inferiores e diabetes, que são patologias comuns em idosos, podem causar feridas crônicas, de difícil tratamento e alto risco de infecções. Os hidrogéis são muito utilizados no tratamento destas feridas; porém, a maioria dos hidrogéis disponíveis no mercado não contém um princípio ativo cicatrizante, funcionando apenas como um agente que favorece uma cicatrização mais rápida. A pele de tilápia, em estudos no tratamento de queimaduras, foi capaz de acelerar o processo cicatricial, o que aumentou o interesse dos pesquisadores em saber qual é o agente que causa este efeito. Portanto, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de um produto cicatrizante, que tem como princípio ativo o colágeno da pele de tilápia com potencial atividade cicatrizante. Para tanto, inicialmente foi realizada a extração do colágeno da pele da tilápia através de uma metodologia de extração de colágeno solúvel em ácido, desenvolvida no Laboratório de Farmacologia da Cicatrização e a determinação do teor de umidade do colágeno extraído por liofilização das amostras. Em seguida, foram desenvolvidas as formulações sem colágeno e com colágeno a 1% e 3% e foram realizados os testes de estabilidade preliminares, que incluiu a aferição do pH, centrifugação (3000 rpm / 30 min) e os testes de viscosidade. Após o primeiro dia de testes, as amostras foram divididas em três ambientes de armazenamento (geladeira, a 8°C; temperatura ambiente, 25°C e estufa, 40°C). Todo o teste de estabilidade durou 14 dias. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. O teor de umidade médio (94,76%), o rendimento (30,74%) e o desvio padrão (2,23% em relação à umidade e 4,27% em relação ao rendimento da extração) demonstraram que a metodologia é reprodutível e garante a extração de grande quantidade de colágeno. Dentre as formulações testadas, a base para hidrogel 3 e as formulações 4 (1% de colágeno) e 5 (3% de colágeno) apresentaram os melhores resultados nos testes de estabilidade preliminar, quanto às propriedades organolépticas, aspecto, homogeneidade, pH e viscosidade. Todas estas considerações foram decisivas para a escolha da melhor formulação de hidrogel para o novo produto à base de colágeno da pele de tilápia, porque além de estável sob refrigeração, a base do produto incorpora facilmente o colágeno, nas duas concentrações propostas para o estudo, de 1% e 3%, tornando possível realizar estudos futuros de caracterização do hidrogel, estudos de estabilidade acelerada e de longa duração e a avaliação do potencial promissor de cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Colágeno. Cicatrização. Farmacotécnica.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF HYDROGEL FORMULATIONS BASED ON COLLAGEN EXTRACTED FROM THE SKIN OF TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

The aging process provides greater fragility to the skin and the appearance of wounds. Lower limb venous hypertension and diabetes, which are common pathologies in the elderly people, can cause chronic wounds that are difficult to treat and have a higher risk of infections. Hydrogels are widely used in the treatment of these wounds; however, most hydrogels available on the market do not contain a healing active ingredient, working as an agent to promote a faster healing. Tilapia skin, according to studies for treatment of burns, was able to accelerate the healing process, which increased researchers' interest in knowing which agent causes this effect. Therefore, the purpose of this work was the development of a healing product, whose active principle is tilapia skin collagen with potential healing activity. Therefore, the extraction of collagen from the tilapia skin was initially carried out using an acid-soluble collagen extraction methodology developed at the Laboratory of Healing Pharmacology and the determination of the moisture content of the collagen extracted by lyophilization of the samples. Then, formulations without collagen and with collagen at 1% and 3% were developed, and preliminary stability tests were carried out, which included pH measurement, centrifugation (3000 rpm / 30 min) and viscosity tests. After the first day of testing, the samples were divided into three storage environments (refrigerator, at 8°C; room temperature, 25°C and oven, 40°C). The entire stability test lasted 14 days. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test for multiple comparisons. The average moisture content (94.76%), yield (30.74%) and standard deviation (2.23% in relation to moisture and 4.27% in relation to extraction yield) showed that the methodology is reproducible and guarantees the extraction of large amounts of collagen. Among the formulations tested, hydrogel base 3 and formulations 4 (1% collagen) and 5 (3% collagen) showed the best results in the preliminary stability tests, regarding organoleptic properties, appearance, homogeneity, pH and viscosity. All these considerations were decisive for choosing the best hydrogel formulation for the new collagen-based product for tilapia skin, because in addition to being stable under refrigeration, the product base easily incorporates collagen, at the two concentrations proposed for the study, 1% and 3%, making it possible to carry out future hydrogel characterization studies, accelerated and long-term stability studies and the evaluation of the promising potential for wound healing.

Keywords: Collagen. Healing. Pharmaceutics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camadas da epiderme	20
Figura 2 - Etapas do desenvolvimento das fibras de colágeno	27
Figura 3 - Lâmina histológica contendo fibroblastos e fibras colágenas	27
Figura 4 - O peixe da espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	29
Figura 5 - Fotos de lâminas histológicas da pele de tilápia (A, B e C) e da pele humana (D e E)	29
Figura 6 - Molécula da carboximetilcelulose	31
Figura 7 – Desenho experimental	33
Figura 8 – Gravuras de etapas diferentes do processo de extração do colágeno	35
Figura 9 - Gravuras das etapas de fabricação dos hidrogéis	39
Figura 10 - As formulações 4 e 5 apresentaram maior estabilidade com o passar da semana	47
Figura 11 - Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de diferentes temperaturas – dia 7	48
Figura 12 - Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de diferentes temperaturas – dia 14.....	49
Figura 13 - Comparação entre as viscosidades no dia 7 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C)	50
Figura 14 - Comparação entre as viscosidades no dia 14 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C)	51
Figura 15 - Comparação da viscosidade das bases em relação ao tempo, nas mesmas condições de armazenamento	52
Figura 16 - Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de base de diferentes temperaturas – dia 7	52
Figura 17 - Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de base de diferentes temperaturas – dia 14	53

Figura 18 - Comparação entre as viscosidades das bases no dia 7 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C)	53
Figura 19 - Comparação entre as viscosidades das bases no dia 14 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C)	54
Figura 20 - Comparação entre as formulações e as respectivas bases que as constituem	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados sobre a determinação do rendimento (3ª extração), utilizados como modelo para aplicar as fórmulas do cálculo	36
Tabela 2 - Tabela contendo os resultados dos cálculos para a determinação do teor de umidade das amostras de pele de tilápia <i>in natura</i>	36
Tabela 3 – Dados do experimento, utilizadas na metodologia como modelo para a aplicação das fórmulas referentes ao cálculo do rendimento	37
Tabela 4 - Formulações desenvolvidas ao longo do trabalho	38
Tabela 5 – Cálculo da quantidade de água e colágeno desidratado de duas extrações de colágeno	41
Tabela 6 – Cálculo da quantidade de água e colágeno desidratado da terceira extração de colágeno. Teste em quintuplicata	42
Tabela 7 - Cálculo da quantidade de água da pele de tilápia desidratada em quintuplicata	42
Tabela 8 - Determinação do teor de umidade da massa de colágeno e da pele de tilápia	42
Tabela 9 - Cálculo do rendimento médio	43
Tabela 10 - Avaliação da estabilidade das formulações quanto ao pH, viscosidade, aspecto e a manutenção da homogeneidade após a centrifugação	43
Tabela 11 - Resultados acerca dos testes de centrifugação. Foi verificada se há dispersão dos componentes do hidrogel, onde há um “x”, indica que não houve separação na formulação e um sinal de “certo”, indica que houve este fenômeno no decorrer do estudo	46
Tabela 12 - Valores de pH aferidos nos dias 1, 7 e 14, em diferentes condições de armazenamento. A partir do dia 7, os valores são divididos em três linhas, sendo a primeira, referente às formulações armazenadas em geladeira (8°C); a segunda, armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e a terceira linha, na estufa (40°C)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	alfa-Actina de Músculo Liso
ASC	Colágeno Solúvel em Ácido
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico básico
CMC	Carboximetilcelulose
cP	Centipoise
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IFN- α	Interferon-alfa
IJF	Instituto Doutor José Frota
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pKa	Logaritmo da Constante de Acidez (Ka)
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 A pele	18
3.2 Feridas	20
3.2.1 Fase inflamatória	21
3.2.2 Fase de granulação e remodelamento	23
3.3 Curativos disponíveis no mercado	23
3.4 Por que desenvolver novos produtos para o tratamento de feridas?	24
3.5 Colágeno	26
3.6 Fontes tradicionais de extração de colágeno	28
3.7 Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	28
3.8 Hidrogel	30
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 Desenho experimental	33
5.2 Extração do colágeno	34
5.3 Determinação do rendimento	35
5.4 Preparo dos hidrogéis	38
5.5 Estudo de estabilidade preliminar	40
5.6 Análise Estatística	40
6 RESULTADOS	41
6.1 Extração do colágeno e determinação do rendimento médio	41

6.2 Pré-formulação e estabilidade preliminar	43
6.2.1 Centrifugação	46
6.2.2 pH	46
6.2.3 Viscosidade	48
7 DISCUSSÃO	58
7.1 A nova metodologia de extração de colágeno da pele de tilápia foi bem-sucedida, considerando a reprodutibilidade e a quantidade extraída	58
7.2 As formulações 4, 5 e a formulação base apresentaram melhor desempenho nos testes de estabilidade	60
7.3 A carboximetilcelulose e o propilenoglicol influenciam na viscosidade, porém, o papel do colágeno neste parâmetro permanece inconclusivo	62
7.4 Análise das propriedades organolépticas no estudo de estabilidade	63
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
9 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O colágeno é um dos princípios ativos mais requisitados pela indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (HUANG *et al.*, 2016). A sua procura tem aumentado atualmente devido ao seu baixo teor calórico, menor risco de reações alérgicas, alta capacidade hidratante, cicatrizante, rejuvenescedora e de reestabelecer o funcionamento das articulações (GONÇALVES *et al.*, 2015). Porém, muitos desafios devem ser ultrapassados para que produtos à base de colágeno tenham maior aceitação por parte do consumidor. Inicialmente, os altos preços praticados pelo mercado são considerados uma limitação para se adquirir o produto. A barreira cultural também é um fator relevante, pois muçulmanos e judeus não consomem derivados do porco e a população indiana não consome produtos derivados do boi. Ambos os animais são responsáveis pela maior parte do colágeno extraído (SCHMIDT *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2012).

Ademais, o colágeno é uma molécula de elevado peso molecular (300 000 Da) e, por esta razão, não atravessa os poros existentes na pele por difusão passiva (GOMES, 2009). Logo, se faz necessário desenvolver uma metodologia adequada de extração, que tenha condições de manter as características desejáveis para futuras aplicações e que não seja baseada em um método destrutivo (SCHMIDT, 2016).

O colágeno extraído da pele de peixes tem sido utilizado para o desenvolvimento de produtos cosmeceuticos pelo fato de auxiliar na reparação da pele e regeneração de tecidos. Peptídeos derivados de peixes marinhos também têm sido utilizados para várias aplicações cosmeceuticas devido às suas atividades antioxidante, antimicrobiana e inibidora de metaloproteinases (SILVA *et al.*, 2012). Além disso, o colágeno e sua forma hidrolisada, apresenta atividade anti-fotoenvelhecimento eficiente, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre é pouco elucidado (VENKATESAN, 2017).

Outro potencial promissor do colágeno é a sua aplicação em tratamento de feridas, visto o sucesso do tratamento com a pele de tilápia em queimaduras (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017). Suscitou-se dúvidas sobre como a pele da tilápia promoveu uma cicatrização rápida, menos dolorosa, sem apresentar focos de infecção durante o tratamento e uma melhor aparência estética da cicatriz, e se há alguma molécula bioativa em particular envolvida nestes achados. O colágeno, por ser a molécula mais

abundante da pele de tilápia (ALVES *et al.*, 2015), se tornou objeto de estudo deste trabalho quanto ao desenvolvimento de formas farmacêuticas para que a molécula possa ser analisada de forma aprofundada.

Portanto, neste trabalho procuramos desenvolver e testar um novo processo de extração do colágeno a partir da pele de peixes, adaptado às necessidades da indústria farmacêutica para uma produção em larga escala. Também realizamos o preparo de formulações com diferentes concentrações de colágeno e excipientes hipoalergênicos para aumentar a tolerabilidade ao uso. Em seguida, realizamos testes de estabilidade para avaliar se o produto desenvolvido pode continuar sendo avaliado em outras etapas futuras, como os estudos de estabilidade acelerado, de longa duração, testes de toxicidade *in vitro* e avaliação do potencial cicatrizante *in vivo*.

2 JUSTIFICATIVA

A pele da tilápia demonstrou ser uma excelente cobertura no tratamento de queimaduras, apresentando cicatrização rápida, diminuição da dor e melhora no aspecto estético do local onde ocorreu a queimadura (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017).

Já estão disponíveis diversos tipos de curativos adequados a vários tipos de ferimento, porém a terapia para feridas crônicas, geralmente decorrentes de doenças metabólicas, continua sendo cara e pouco acessível (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

Com a repercussão dos resultados obtidos com a pele da tilápia (MANFREDI *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; LIMA-VERDE *et al.*, 2021), foi possível desenvolver e estudar a aplicabilidade dos derivados deste tecido. Um exemplo são os scaffolds, que consistem em cortes da pele de tilápia descelularizados, que apresentou bons resultados em cirurgias ginecológicas reparadoras (LAU *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Outro derivado em estudo é o colágeno, que tem um excelente potencial para ser utilizado como cicatrizante, e para estudar futuramente esta função, faz-se necessário o desenvolvimento de formulações que incorporem a proteína de forma estável. Neste trabalho desenvolvemos os hidrogéis e realizamos estudos de estabilidade preliminar para

avaliar o desempenho das formulações com o tempo e escolher quais deverão ser utilizadas nos próximos testes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A pele

A pele é um tecido que protege os órgãos internos contra agentes externos potencialmente danosos para a manutenção da homeostase do organismo. Em humanos, existem cinco camadas na epiderme: camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e estrato córneo (VRACKO, 2019). A cada 28 dias, os queratinócitos basais totalmente diferenciados com grandes núcleos, organelas e membrana plasmática fosfolipídica migram no sentido ascendente da camada basal para camadas espinhosas e granulares. Durante esse processo de renovação, ocorre um acúmulo de queratina e lipídios que, em seguida, sofre diferenciação terminal para formar as camadas de células do estrato córneo (WICHETT e VISSCHER, 2006).

A epiderme é um tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, que é a porção da pele que mantém a permeabilidade seletiva (BOER *et al.*, 2016). O estrato córneo é a camada mais externa, impermeável a produtos químicos e microorganismos, além de regular a liberação de água a fim de evitar a desidratação (PROKSCH, 2008). É organizado em uma pilha de queratinócitos planos e anucleados, incrustados de queratina (proteína impermeabilizante) imersos em uma matriz intercelular composta por substâncias hidrofóbicas, como os lipídios, por exemplo, e estas células são conectadas por junções comunicantes conhecidas como corneodesmosomos (GRAHAM *et al.*, 2019; ABDO *et al.*, 2020).

O estrato lúcido é presente em áreas de “pele grossa”, na planta dos pés e nas mãos, é uma camada delgada, de células mortas, sem núcleo ou grânulos, coberta por queratina (YOUSEF, 2020).

A camada granulosa, que está logo abaixo do estrato córneo, é composta por três camadas de células poligonais, achatadas, com núcleo central e citoplasma repleto de grânulos querato-hialinos e lamelares, que potencializam a função da queratina, impermeabilizando a pele e com a posterior proteólise destes grânulos, é formado o Fator de Hidratação Natural, que é essencial para a hidratação do estrato córneo (ROBINSON *et al.*, 2010).

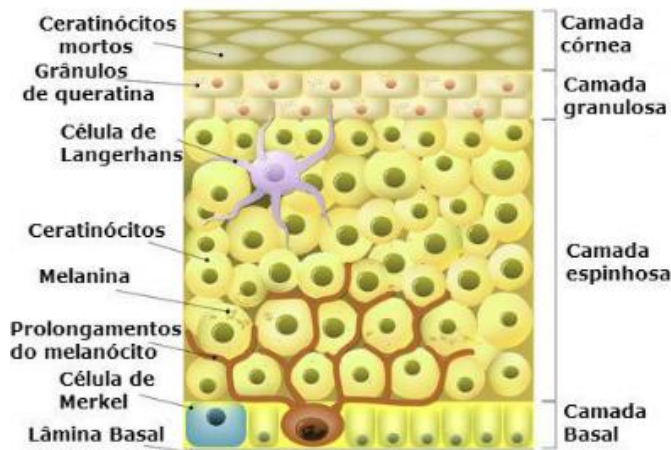
Mais profundamente, a camada espinhosa, que contém 8-10 camadas de células, também conhecidas como camada de células espinhosas, contém células poliédricas irregulares com prolongamentos no citoplasma, chamados de “espinhos”, que se estendem para fora, por onde se conectam com células vizinhas por desmossomos. As células dendríticas – também conhecidas como células de Langerhans, que são células residentes e têm função de apresentação de antígenos podem ser encontradas nesta camada (YOUSEF, 2020).

A camada basal produz as células que se diferenciam posteriormente em queratinócitos e melanócitos, terminações nervosas sensitivas e células de Merkel, que são originadas do tecido nervoso e as células de Langerhans e recebe nutrientes da derme através da junção dermo-epidérmica (RIVITTI, 2014).

Dentre as funções da pele está a fotoproteção, termorregulação, barreira física contra choques mecânicos. Além disso, a pele é a grande protagonista da resposta imune, auxiliando na imunidade inata e adaptativa, por intermédio das células dendríticas e macrófagos residentes que têm como função a apresentação de antígenos e fagocitar patógenos. Há mecanismos que permitem que este tecido regule o próprio crescimento e diferenciação através da interação com as citocinas liberadas por linfócitos T CD4, que dependendo do perfil (inflamatório ou anti-inflamatório), orientam as modificações na espessura da pele. A desregulação nos mecanismos de tolerância imune em relação às estruturas da pele promove uma resposta de defesa destrutiva do próprio tecido. Isto ocorre principalmente em patologias como a dermatite atópica e a psoríase (ARMSTRONG e READ, 2020; HÄNEL *et al.*, 2013; SHWAYDER e AKLAND, 2005).

A manutenção das características funcionais da pele pode ser prejudicada com o avanço da idade ou causadas por rupturas da continuidade do tecido, mais comumente causadas por quedas, queimaduras, radiação e procedimentos cirúrgicos, que são conhecidas como feridas (BOATENG, 2008).

Figura 1: Camadas da epiderme



Fonte: Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/epiderme/>. Acesso em janeiro de 2021.

3.2 Feridas

Em determinadas situações, as agressões externas (físicas ou térmicas, por exemplo) são capazes de gerar uma ruptura na continuidade do revestimento epitelial, pois a pele, como é a primeira barreira do corpo é a mais suscetível às lesões causando impactos significativos para o orçamento dos pacientes e para os sistemas de saúde (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Alguns exemplos de etiologias de feridas mais comuns são os traumatismos, queimaduras, úlceras por pressão, úlceras por hipertensão venosa, feridas em membros inferiores de indivíduos diabéticos e feridas por radioterapia (SMANIOTTO, 2012).

Quanto à classificação do grau de profundidade do ferimento: a lesão que afeta apenas a superfície epidérmica é classificada como uma ferida superficial, e outras que, além da superfície, afetam também a derme é chamada de ferida de espessura parcial (COSTIN e HEARING, 2007). São classificadas como feridas de espessura total quando a gordura subcutânea subjacente ou tecidos mais profundos são danificados, além da epiderme e das camadas dérmicas, o que é muito comum de ocorrer em lesões por pressão (FERREIRA, 2006).

As feridas também podem ser classificadas quanto ao tempo em que permanecem abertas. As feridas agudas são geralmente lesões teciduais que cicatrizam completamente, de forma organizada, deixando poucos vestígios ou nenhuma cicatriz (SINGER e CLARK, 1999). O processo desde o início da lesão até

o remodelamento geralmente dura de 8 a 12 semanas (PERCIVAL, 2002). Os tipos de feridas agudas mais graves as lesões decorrentes da exposição à radiação, eletricidade, produtos químicos corrosivos e fontes térmicas (LAZARUS et al., 1994).

Todas as feridas são consideradas agudas a partir do momento em que são demarcadas na pele, e o que a diferencia da ferida crônica é o progresso da cicatrização até o fechamento da ferida (WHITNEY, 2005). A ferida crônica é uma lesão em que a cicatrização demora a ocorrer ou não ocorre, mantendo assim, um quadro inflamatório constante (KOH e DIPIETRO, 2011). Em escala global, as feridas crônicas mais comuns são as causadas por úlceras venosas, diabetes (MEDMARKET DILIGENCE, 2013) e hemoglobinopatias (JUNG *et al*, 2016), que são muito comuns na velhice. O tratamento padrão para estas feridas envolve a avaliação do paciente e da ferida, limpeza, desbridamento do tecido necrótico e infectado, uso de antibióticos e trocas regulares de curativos (FRYKBERG & BANKS, 2015). O tratamento das feridas crônicas geralmente é longo e de alto custo, e a melhor prevenção seria tratar a patologia primária causadora da cronicidade das lesões.

Uma outra questão relacionada à cicatrização envolve a atividade de diferenciação do tecido. Na maioria dos casos, a cicatrização restaura a função e a resistência à tração semelhantes ao tecido que fora destruído. Porém, em alguns casos, é formada uma cicatriz fibrótica, que não repara a função do tecido que estava no local anteriormente. Ademais, quando a cicatrização é excessiva, é formada uma estrutura fibrótica hipertrófica, conhecida como quelóide (WALMSLEY *et al.*, 2015).

A cicatrização completa é o objetivo principal de todos os tratamentos para feridas. Até alcançar este objetivo de curar totalmente a ferida, há diversos mecanismos celulares, fisiológicos, químicos e moleculares envolvidos durante quatro fases: inflamação, hemostasia, granulação e remodelamento.

3.2.1 Fase infamatória

A cicatrização é um processo dinâmico, que envolve mediadores solúveis (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento), células sanguíneas e matriz extracelular, ocorrendo por regeneração ou reparação (SINGER e CLARK, 1999). Imediatamente após a lesão, é iniciada a cascata de coagulação para ocluir a descontinuidade da parede do vaso. Também são liberadas substâncias vasoativas

(serotonina, histaminas, prostaglandinas e leucotrienos), proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases (MANDELBAUM, 2003). Esses eventos permitem o fechamento das bordas e o controle do sangramento. A hemostasia é a primeira etapa da cicatrização, que consiste na liberação de mediadores como endotelina e PDGF pelas plaquetas, os quais promovem uma vasoconstrição na parede do vaso afetado pelo ferimento. Em seguida, é ativada a cascata de coagulação, que encerra a passagem de sangue para fora do vaso sanguíneo (BERTHET, 2012).

A fibronectina, que é uma glicoproteína sintetizada por células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais tem o papel de se aderir à fibrina e ao colágeno, mantendo firme o coágulo de fibrina. Além de formar essa base para a matriz extracelular, a fibronectina tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de microrganismos potencialmente patogênicos. (MANDELBAUM, 2003).

A inflamação é a base de todo o processo de cicatrização por ser a fase de remoção dos agentes patogênicos e das estruturas danificadas pela injúria tecidual (MANDELBAUM, 2003). Mediadores inflamatórios (citocinas, cininas, eicosanoides e quimiocinas) sinalizam para que leucócitos e macrófagos (ROWAN, 2015) se desloquem até o sítio da lesão e iniciem o processo inflamatório, fagocitando patógenos que tentam acessar o organismo através do ferimento (NETO, 2003; OLIVEIRA, 2012).

Os neutrófilos e os macrófagos, além da função fagocítica, liberam citocinas como IL-1, IL-2, IFN- α e uma citocina de particular importância que é o TNF- α . O TNF- α pode amplificar a quimiotaxia de neutrófilos e estimular macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e a expressão de fatores de crescimento necessários na angiogênese e síntese de colágeno (MEDEIROS, 2016). Ambas as células, além da fagocitose, liberam espécies reativas de oxigênio, a fim de destruir as membranas celulares de patógenos – principalmente bactérias –, inviabilizando a invasão e a proliferação dos microrganismos (BALBINO, PEREIRA E CURI, 2005). Após a finalização do processo de desbridamento (remoção do tecido necrótico) orquestrado pelo macrófago e pelo neutrófilo, é iniciada a fase de reparo tecidual.

3.2.2 Fase de granulação e remodelamento

A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e a formação de fibras de colágeno, que é a principal proteína estrutural presente na matriz extracelular, que atribui firmeza ao novo tecido (CAMPOS, 2007). O início da fase de granulação (ou proliferativa) ocorre através de mediadores emitidos pelo macrófago para o recrutamento de fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias (RODRIGUES, 2018). Os fibroblastos produzem colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos para compor a nova matriz extracelular (DVORAK, 2005). Os queratinócitos passam a migrar das bordas para o centro da ferida, cobrindo o tecido e formando uma cicatriz. A fase proliferativa costuma durar entre 2-4 semanas e ao final, os fibroblastos sofrem apoptose, as fibras colágenas do tipo III são substituídas pelas fibras do tipo I, e os vasos sanguíneos formados durante a fase proliferativa são destruídos, concluindo assim a cicatrização e o remodelamento da pele (GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

3.3 Curativos disponíveis no mercado

A seleção do curativo deve ser baseada em sua capacidade de: (1) fornecer ou manter o ambiente úmido, (2) promover a migração epidérmica, (3) promover a angiogênese e a síntese do tecido conjuntivo, (4) permitir a troca gasosa entre o tecido lesado e o ambiente, para o leito da ferida e melhora a migração epidérmica, (5) fornecer proteção contra infecção bacteriana, o qual deve ser não aderente à ferida e fácil de remover após a cicatrização, (6) fornecer um ambiente favorável ao desbridamento para melhorar a migração de leucócitos e (7) apoiar o acúmulo de enzima e deve ser estéril, não tóxico e não alérgico. (DHIVYA, 2015).

Existem diversos tipos de curativos e coberturas disponíveis no mercado, que devem ser aplicados em diferentes tipos de lesões. Esse tipo de material é útil nas seguintes etapas de recuperação do tegumento: higienização, desbridamento, diminuição da população bacteriana, controle do exsudato, estímulo à granulação e proteção da reepitelização (SMANIOTTO, 2012). Outras dificuldades encontradas durante o tratamento das feridas é a questão da ferida crônica, que geralmente é resultado de uma lesão por pressão, úlcera venosas e queimaduras (DHYVIA, 2015). Estes tipos de lesões muitas vezes não se curam através de tratamentos convencionais e como a área afetada serve de porta de entrada para os

microrganismos, o risco de ocorrer uma infecção no indivíduo é muito maior. Aparentemente, a lesão permanece na fase inflamatória de forma persistente. Algumas doenças, como a diabetes e a Síndrome de Ehlers-Danlos (doença que tem como origem um defeito na fibrillogênese do colágeno do tipo I) contribuem para que a ferida tenha um prognóstico ruim (BYERS, 2012).

“Na Inglaterra, os custos do tratamento de úlceras de pressão podem chegar a até 6.500 libras por paciente (> \$ 8.000 dólares americanos). Da mesma forma, nos Estados Unidos, o custo médio dos gastos do Medicare em úlceras de pressão e arteriais em 2014 foi de \$ 3.696 e \$ 9.015 por paciente, respectivamente - os dois mais caros de todos os tipos de feridas incluídos no estudo”. (KRZYSZCZYK, 2018).

Devido a essas questões que dificultam o tratamento de feridas agudas e principalmente as crônicas, faz-se necessário o desenvolvimento de produtos que sejam de fácil acesso, manufatura simples e de baixo custo, maior eficiência, custo-benefício e custo-efetividade. Dentre as novas pesquisas desta corrida para solucionar a falta de medicamentos, curativos e coberturas, um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará estão desenvolvendo materiais derivados da pele da tilápia para tratar feridas e queimaduras (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017).

3.4 Por que desenvolver novos produtos para o tratamento de feridas?

As feridas crônicas e as extensas são lesões que, além de causarem muita dor e prejudicar a qualidade de vida das pessoas que as possuem, os tratamentos disponíveis são muito dispendiosos e a eficácia é muito reduzida (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017), tanto pelo tempo de tratamento quando pelos recursos materiais e humanos necessários. Os maiores desafios no tratamento de feridas estão relacionados às úlceras de origem venosa, feridas em diabéticos e lesões por pressão, que são as lesões crônicas mais comuns (MEDMARKET DILIGENCE, 2015), expõe o quanto o mercado está defasado de tratamentos acessíveis e ao mesmo tempo eficazes para solucionar finalmente o sofrimento causado por estas patologias.

Pesquisadores da Universidade Federal do Ceará e médicos (Marcelo Borges e Edmar Maciel) passaram a estudar a ação da pele da tilápia, primeiro em ratos e em seguida, nos pacientes do Instituto Dr. José Frota (IJF). Estudos realizados pelo grupo de pesquisadores do Projeto Pele de Tilápia utilizaram 4 grupos de ratos,

sendo 2 tratados com sulfadiazina de prata e outros dois com a pele da tilápia. Dentro dos macrogrupos de tratamento, um teve a queimadura induzida de primeiro grau e o outro, de segundo (LIMA-JÚNIOR et al., 2017).

“O padrão de cicatrização observado nos grupos tratados com a pele da tilápia foi superior devido à sua capacidade de obstruir a ferida, minimizando exsudatos e a formação de crostas. No presente estudo, foram encontradas reações inflamatórias de intensidade leve a moderada nas feridas recobertas pelas peles de tilápia, com fenótipo mononuclear (histiolinfoplasmocitário), diferentemente da intensa resposta aguda observada nos grupos controle, interferindo positivamente no processo de cicatrização, confirmando o benefício de sua utilização”. (LIMA-JÚNIOR et al., 2017).

Em análises histológicas da pele da tilápia, foi encontrada uma grande quantidade de colágeno do tipo I no tecido conjuntivo frouxo e na hipoderme (ALVES et al., 2015). Comparado à pele humana, observou-se que o colágeno do tipo I na pele da tilápia é muito mais abundante. É uma tarefa árdua para os desenvolvedores de medicamentos, cosméticos e de suplementos encontrarem formulações que atenda a maioria do mercado consumidor. Por essa razão muitos optaram por desenvolver alternativas ao colágeno bovino, devido ao risco de encefalopatia espongiiforme bovina e como alternativa ao colágeno derivado de suínos para uso em países judeus e muçulmanos. (SCHIMIDT, 2016). Dentre as alternativas está o colágeno da pele da tilápia.

O colágeno extraído da pele da tilápia possui características que permitem que esta seja utilizada como princípio ativo. Esta proteína tem uma característica singular, pois contém aminoácidos não encontrados em outras proteínas, como a hidroxilisina e a hidroxiprolina, que são classificadas como aminoácidos não essenciais, isto é, já são produzidas pelo próprio organismo (GONÇALVES, 2015).). Como há um declínio na produção das fibras de colágeno a partir dos 30 anos (ORTOLAN, 2013), a reposição fornece os aminoácidos para formar novas proteínas de colágeno e, conseqüentemente, novas fibras. A partir destas informações, o trabalho tem como hipótese que a administração de produtos com colágeno torne o período de cicatrização curto, fornecendo a proteína para a restauração de vasos sanguíneos danificados e a construção de novos, e organização das células da pele na formação do tecido cicatrizado.

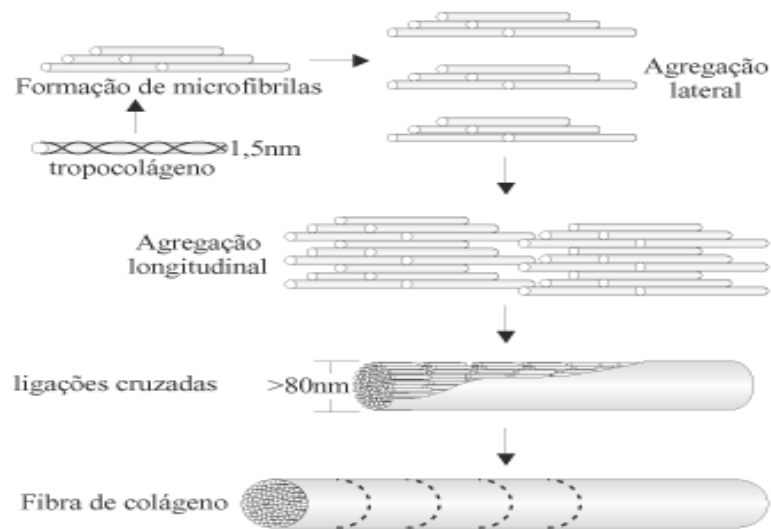
3.5 Colágeno

O colágeno está presente em estruturas muito importantes para o funcionamento e a manutenção da homeostasia do organismo. Está presente nos tendões, ligamentos, ossos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e na pele. Isso faz com que estas estruturas se mantenham firmes e ao mesmo tempo maleáveis (pouco vulneráveis à quebra durante a realização de movimentos) (VARGAS, AUDÍ E CARRASCOSA, 1997).

O colágeno é sintetizado pelo organismo desde a fase embrionária por células especializadas em produzir estruturas fibrilares (colágeno e elastina), denominadas fibroblastos. Já são conhecidas 28 isoformas da proteína e 46 cadeias polipeptídicas (SHOULDERS, 2009). Além disso, existem diversas moléculas com domínios colágenos. O que muda de uma para outra são as suas configurações. São constituídas predominantemente de glicina, prolina e hidroxiprolina. O percentual das três juntas é aproximadamente 50% do total do conteúdo de aminoácidos. Sua massa molecular é de aproximadamente 300.000 Da e é estabilizado por pontes de hidrogênio, forças intermoleculares (van der Waals, dipolo-dipolo) e ligações cruzadas covalentes entre as cadeias (SILVA E PENNA, 2012).

Para a tripla hélice ser formada é necessário que existam resíduos de glicina (Gly) a cada terceira posição ao longo da cadeia, formando uma unidade repetitiva do triplete Gly-X-Y na sequência de aminoácidos, onde o Y geralmente é ocupado pelos aminoácidos prolina e hidroxiprolina (BRODSKY e RAMSHAW, 1997; GONÇALVES, 2015).

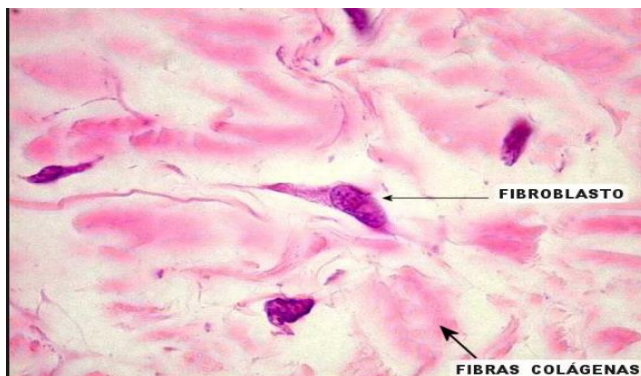
Figura 2: Etapas do desenvolvimento das fibras de colágeno.



Fonte: CHAUDRY, 1997.

Outra característica singular dessa molécula é que nenhuma outra proteína tem quantidades tão grandes de prolina e hidroxiprolina na sua constituição, o que faz da molécula majoritariamente composta por aminoácidos não essenciais, ou seja, normalmente produzidos pelo organismo (COSTA, 2013). Porém, com o avançar da idade, a produção de colágeno reduz drasticamente. Estima-se que a partir dos 30 anos, a quantidade de colágeno produzido cai 1% ao ano (GONÇALVES, 2015). Os sinais mais evidentes do processo são a queda da espessura e elasticidade da pele, fragilidade progressiva dos ossos (que associada à desmineralização potencializa o risco de fraturas) e surgimento de marcas de expressão – as rugas. Por isso é indispensável a reposição, já que a síntese pelo organismo sofre redução progressiva com a idade (ORTOLAN, 2013).

Figura 3: Lâmina histológica contendo fibroblastos e fibras colágenas.



Fonte: Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/biossifmembranosa.html>.

3.6 Fontes tradicionais de extração do colágeno

A preferência pelo colágeno tem crescido muito por poder ser aplicado em vários produtos (cosméticos e alimentos principalmente) devido às suas características principais, que consistem no alto teor de proteína e suas propriedades funcionais, como capacidade de absorção de água, formação de gel e a capacidade de formar e estabilizar emulsões (SCHMIDT, 2016).

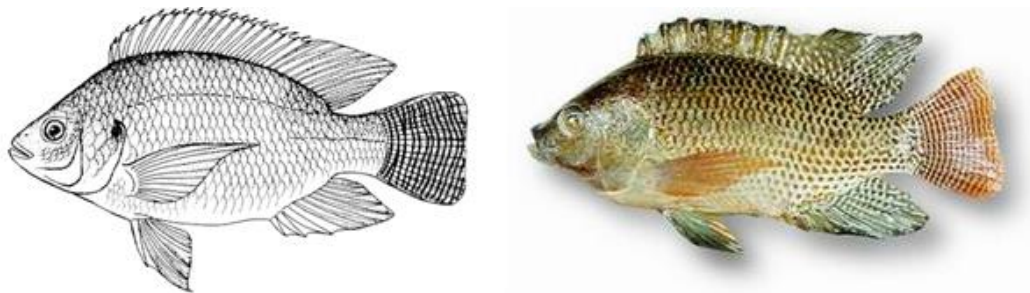
Usualmente, o colágeno é extraído da pele e ossos do porco e do boi. O método de extração mais utilizado nesse caso é a extração em meio ácido ou alcalino (SILVA, 2011). Na maioria das vezes, o colágeno extraído desses animais é convertido em gelatina ao submeter o colágeno a temperaturas altas em água por poucas horas. Porém, o uso do colágeno com essa origem é muito controverso, porque existem populações que não consomem quaisquer materiais extraídos do porco, que é o caso de judeus e muçulmanos. A rejeição de produtos de origem bovina por parte dos indianos e a “Doença da Vaca Louca” também restringem o comércio do colágeno de origem bovina (NALINANON et al., 2010).

Por isso, tornou-se necessário a descoberta de alternativas para aumentar o mercado consumidor e reduzir a possibilidade de haver essas barreiras. Outro fator relevante é a busca por processos de custo baixo, menor tempo de produção, maior quantidade de matéria-prima disponível para o uso e maior rendimento. As peles dos peixes então se tornaram uma excelente opção.

3.7 Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia é um peixe de origem africana. Existem evidências de seu cultivo desde 4.000 a.C. pelos egípcios. Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), o peixe, por ter características favoráveis ao cultivo, foi introduzido em outras áreas do planeta na década de 1960, e no Brasil em 1971. Dentre as regiões que mais produzem, destacam-se o nordeste brasileiro, com o Ceará consolidando-se como o maior produtor de tilápia no país (VICENTE, 2014).

Figura 4: O peixe da espécie *Oreochromis niloticus*.

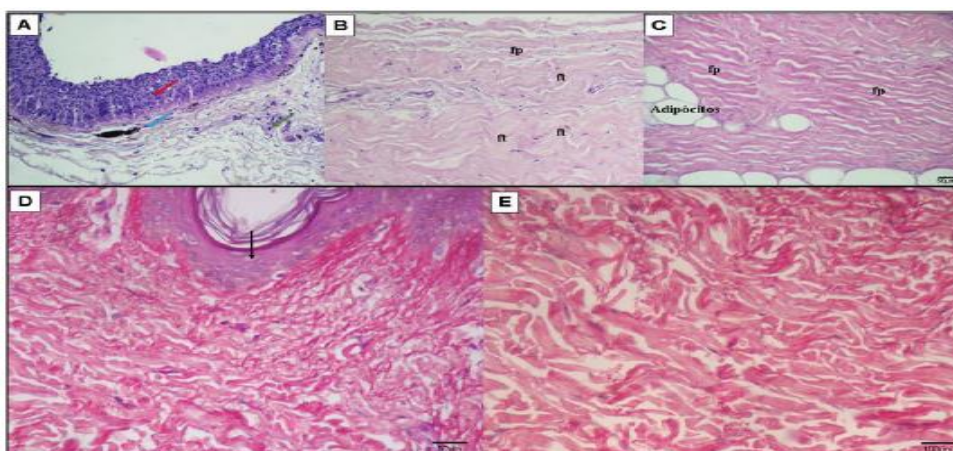


FONTE: FAO, 2010

A pele desse animal foi escolhida para a condução do estudo de novos cicatrizantes para queimaduras, porque tem uma resistência característica e ser riquíssima em colágeno (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017), além do fácil acesso a esta matéria-prima, já que o Ceará é um dos estados que mais cultivam a tilápia.

Ademais, estudos com a pele do animal afirmaram que a pele da tilápia apresentava muitas semelhanças com a pele humana, bastante maleável e resistente à tração (ALVES *et al.*, 2015). A imunogenicidade do colágeno é extremamente baixa. Por essa razão a pele da tilápia é considerada uma boa alternativa para a substituição da produção de colágeno, normalmente realizada a partir de subprodutos de origem bovina ou suína (DUAN *et al.*, 2009).

Figura 5: Fotos de lâminas histológicas da pele de tilápia (A, B e C) e da pele humana (D e E).



Fonte: ALVES, 2015.

Pesquisadores realizaram testes que determinassem a composição centesimal da pele da tilápia, pelo método de Kjeldahl, que é uma técnica muito utilizada no controle de qualidade de alimentos e consiste em detectar a quantidade de nitrogênio orgânico disponível na amostra. No final de todas as etapas, são realizados cálculos utilizando o fator de correção para converter o resultado para proteínas (BASSO, 2013).

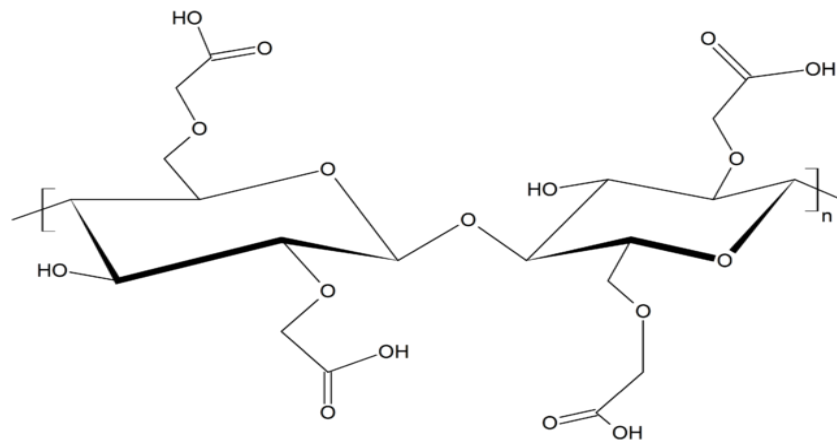
3.8 Hidrogel

Os hidrogéis são formas de dosagem semissólidas, consistindo em redes tridimensionais de materiais solúveis em água de origem polimérica, proteica, peptídica, coloidal, surfactante ou lipídica, com uma estrutura reticulada (HOARE, 2008). Esse tipo de forma farmacêutica pode ser produzido para se tornar um sistema de liberação de fármacos a partir de nanocarreadores, formulações com princípios ativos e uma película de revestimento para formas farmacêuticas sólidas de liberação controlada (comprimidos e pellets, principalmente) (ROHR, 2007).

Os curativos de hidrogel são a nova aposta para um sistema de liberação de fármacos mais eficaz. O hidrogel é caracterizado como um gel com alto teor de água formado por polímeros insolúveis, responsáveis pelo intumescimento da mistura. Dentre os agentes gelificantes estão a carboximetilcelulose, hemicelulose, ágar, glicerol e pectina. Ao contrário dos curativos de filme, como o de poliuretano, por exemplo, eles têm mais capacidade de absorver exsudatos e, portanto, podem ser aplicados em ferimentos altamente exsudativos (WASIAK *et al*, 2013).

A quantidade grande de água do hidrogel pode favorecer na manutenção do microambiente da ferida úmido, favorecendo o desbridamento autolítico, ou seja, a umidade auxilia na atividade de enzimas e na solubilização de mediadores quimioatraentes para neutrófilos e macrófagos alcançarem o leito da ferida e iniciem a fagocitose. A hidratação também favorece a incorporação de princípios ativos com facilidade. Sua estrutura porosa e baixa tensão interfacial com a água, ou os próprios fluidos biológicos de quem recebe este tratamento, tornam os hidrogéis excelentes alternativas para a encapsulação de ingredientes farmacêuticos ativos ou entidades terapêuticas como proteínas e peptídeos (GHICA, 2016).

Figura 6: Molécula da carboximetilcelulose



Fonte: Imagem disponível em: <https://maestrovirtuale.com/carboximetilcelulose-caracteristicas-estrutura-sintese-usos/>. Acesso em abril de 2021.

A carboximetilcelulose é um dos polímeros mais utilizados no preparo de hidrogéis. Isso é o resultado de sua alta capacidade de absorção de água, baixa imunogenicidade e excelente biocompatibilidade com a pele e membranas mucosas (LIMA, 2014). A carboximetilcelulose é o principal polímero que mantém um ambiente úmido ideal ao nível das lesões, estimulando a formação da matriz extracelular e a reepitelização, conseqüentemente (HEBEISH, 2012). Por esta razão, neste trabalho será produzida a formulação utilizando como veículo o hidrogel de carboximetilcelulose.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral: Desenvolver uma formulação de hidrogel contendo colágeno extraído da pele de tilápia com viscosidade e estabilidade adequadas para aplicabilidade no tratamento de feridas em estudo pré-clínico.

4.2 Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Testar o protocolo de extração e calcular o rendimento obtido por esse processo através da determinação do percentual de umidade das amostras de colágeno.

Objetivo específico 2: Produzir as formulações, optando por excipientes hipoalergênicos e por concentrações adequadas para garantir a incorporação completa do colágeno à formulação.

Objetivo específico 3: Testar a estabilidade das formulações, observando as variações na viscosidade, homogeneidade da formulação, pH, cor e detectando se há ou não fragmentos de colágeno não solubilizados.

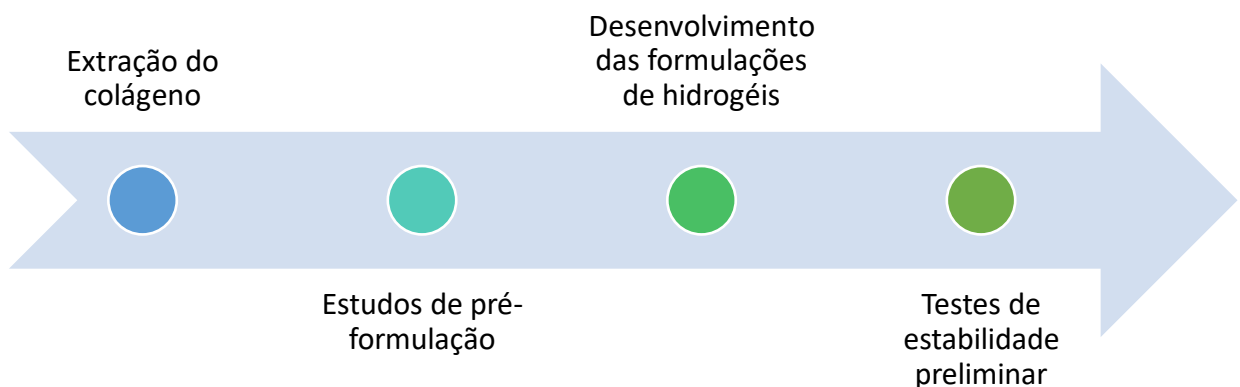
5 METODOLOGIA

5.1 Desenho experimental e local de estudo

O trabalho desenvolvido foi do tipo experimental, realizado na Universidade Federal do Ceará – no Laboratório de Farmacologia da Cicatrização, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos e Laboratório de Cosmetologia, do Departamento de Farmácia.

Inicialmente, foram realizados estudos para a definição da metodologia para a extração do colágeno da pele de tilápia com boa qualidade e quantidade para que em seguida fossem conduzidos testes de pré-formulação para verificar qual a melhor composição do hidrogel para incorporar totalmente o colágeno. As formulações desenvolvidas passaram por um estudo de estabilidade preliminar, onde foram avaliadas a viscosidade, pH, odor, cor, aspecto, e se houve separação do colágeno do hidrogel.

Figura 7: Desenho experimental



Fonte: Dados da pesquisa

5.2 Extração do colágeno

Foi utilizado o método de extração desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Cicatrização, da Universidade Federal do Ceará, que é resultado de modificações nos modelos propostos por KIM (2012) e NALINANON (2010), utilizando matérias-primas mais acessíveis, colágeno hidrolisado e tempo otimizado.

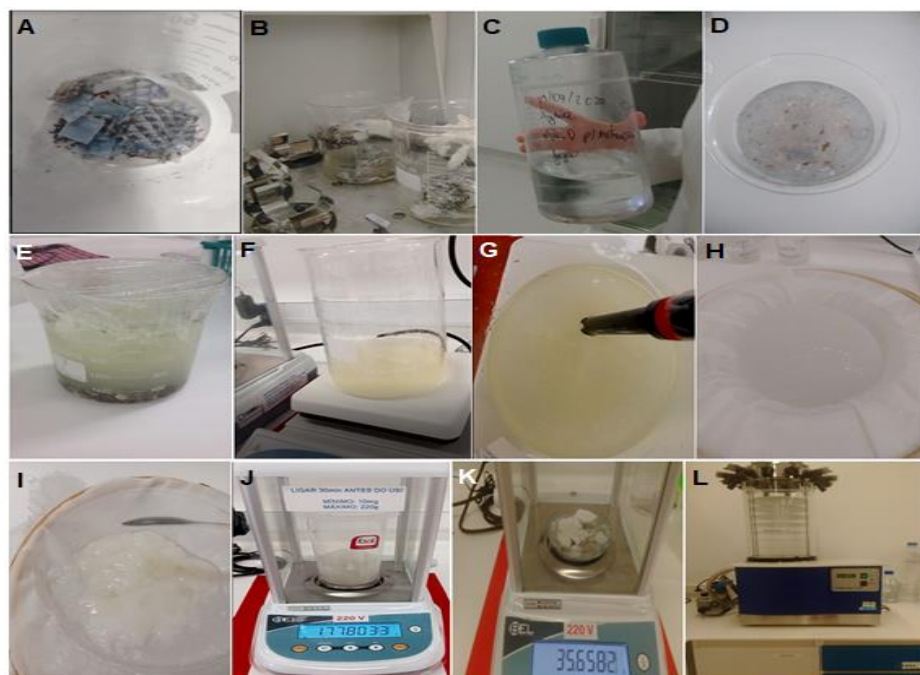
Primeiramente, a pele da tilápia foi cortada em pedaços de 1 cm x 1 cm, incubados em solução de Polissorbato 20 (Tween-20) a 2%, na proporção de 1 g de pele: 10 ml de solução. Foram utilizados 20 g de pele e 200 ml de solução, e como são duas trocas, foi preciso preparar 400 ml. O processo durou 4 h, sendo necessária uma troca da solução a cada 2 h.

Em seguida, foram feitas 3 lavagens, uma durante agitação por 2 h e outras duas de 1h cada, com 30 ml de água destilada para 1g de tecido. Após este procedimento, os fragmentos da pele da tilápia foram incubados em uma solução de ácido clorídrico (HCl) de pH = 1,20. Foi acrescentado 20 g de pele para 600 ml de solução (1:30), sob constante agitação durante 16 h (*overnight*). No dia seguinte, a solução foi filtrada com o auxílio de um tecido composto por 100% de poliéster, sendo reservado o filtrado, e o precipitado passou por uma segunda extração com HCl de pH = 1,2 durante 16 h. Depois deste prazo foi realizada outra filtração e o precipitado foi entregue para descarte no lixo biológico. Todo o protocolo experimental foi realizado à temperatura de 18°C e as incubações foram mantidas sob constante agitação de 130 rpm.

Os dois filtrados tiveram o pH ajustado para que a solução atingisse valores entre 7,5 e 8,0, com adição progressiva de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, sob agitação variável entre 200 e 600 rpm e a variação do pH foi aferida com o pHmetro (Ohaus, Barueri, Brasil). A faixa de pH entre 7,5 e 8,0, onde é localizado o ponto isoelétrico da proteína, é ideal para a precipitação isoelétrica do colágeno.

As soluções então foram novamente filtradas e o colágeno que ficou retido no tecido foi lavado com água levemente alcalina (pH = 8,0) e em seguida, passou por secagem através de torções suaves no tecido onde estava retido. Por fim, a massa de colágeno foi pesada, armazenada em um pote de plástico estéril, identificado com a data e o peso.

Figura 8: Gravuras de etapas diferentes do processo de extração do colágeno. **(A)** Corte da pele da tilápia em pedaços quadrados de 1cm x 1cm, **(B)** Incubação da pele da tilápia em solução de Tween 20 2% sob agitação, **(C)** 3 incubações foram feitas com Água Mili-Q, para diminuir quaisquer presenças de sais que possam interagir com o colágeno, **(D)** Amostra de pele de tilápia após a primeira incubação em HCl pH=1,2, **(E)** Solução de extração de colágeno após a segunda incubação em HCl pH=1,2, **(F)** Sobrenadante da segunda extração antes da precipitação do colágeno em pH 75 – 8,0, **(G)** Solução de colágeno ao atingir o ponto isoelétrico, com o colágeno insolúvel, **(H)** Retenção do colágeno precipitado no filtro, que foi em seguida lavado em pH = 8,0 para reter a maior quantidade possível de colágeno, **(I)** Colágeno antes da pesagem, **(J)** Pesagem do colágeno, **(K)** Pesagem da placa de Petri com a amostra antes da liofilização, **(L)** Liofilização da placa de Petri.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Determinação do rendimento

Para avaliar o rendimento, foi retirada uma alíquota de 10 g de cada extração (foram realizadas 3 no total) e as três amostras foram colocadas em placas de Petri separadas para serem resfriadas a - 80 °C e inseridas no liofilizador (Liobrás, São Carlos, Brasil), onde foram mantidas durante 48h. Depois da liofilização, as amostras foram pesadas. Um outro processo de liofilização foi realizado, desta vez com cinco amostras de 10 g de pele da tilápia cada. Após a conclusão das duas liofilizações, foi determinado o rendimento de cada uma das extrações e o rendimento médio, verificando também se os resultados são reprodutíveis. O cálculo do rendimento foi realizado da seguinte maneira:

Tabela 1: Tabela contendo os resultados dos cálculos para a determinação do teor de umidade das amostras de colágeno. Dados fictícios.

Amostras da extração de colágeno (dados fictícios)							
Amostras	Placa vazia	Colágeno úmido (C)	P + C	Placa + colágeno desidratado (pcl)	Água (A)	Colágeno desidratado (Cd)	Percentual de umidade (100*A/C)
1	30,05	2,01	32,06	31,20	0,86	1,15	42,79
2	30,10	2,03	32,13	31,30	0,83	1,20	40,89
3	30,20	2,05	32,25	31,35	0,90	1,15	43,90
4	30,30	2,03	32,33	31,37	0,96	1,07	47,29
5	30,40	2,01	32,41	31,39	1,02	0,99	50,75
Média	30,21	2,03	32,24	31,32	0,91	1,11	45,12
Desvio Padrão	0,14	0,02	0,14	0,08	0,08	0,08	3,91

Fonte: Ilustrações do trabalho.

Primeiramente foi inserido os dados com os valores do peso da placa vazia, da massa de colágeno úmida, o peso da placa contendo o colágeno úmido (Pc) e da placa contendo o colágeno liofilizado (Pcl). Em seguida, o teor de água foi definido através da subtração: Pc- Pcl. A quantidade real de colágeno foi resultado da subtração entre o colágeno úmido e o teor de água (C – Cd). Por fim, o teor percentual de umidade foi determinado pela equação $U=100*A/C$. A determinação da umidade da pele da tilápia foi obtida na mesma sequência de cálculos.

Tabela 2: Tabela contendo os resultados dos cálculos para a determinação do teor de umidade das amostras de pele de tilápia *in natura*. Dados fictícios.

Teor de água da pele da tilápia							
Repetição	Placa vazia (P)	Pele úmida (pt)	Placa + pele úmida (P + pt)	Placa + pele desidratada (P + pd)	Água (A)	Pele desidratada (pd)	Umidade (100*A/pt)
1	30,10	2,01	32,11	30,9	1,21	0,8	60,20
2	30,20	2,05	32,25	31	1,25	0,8	60,98
3	30,30	2,09	32,39	31,1	1,29	0,8	61,72
4	30,40	2,05	32,45	31,2	1,25	0,8	60,98
5	30,30	2,01	32,31	31,1	1,21	0,8	60,20
Médias	30,26	2,04	32,30	31,06	1,24	0,80	60,81

Desvio Padrão	0,11	0,03	0,13	0,11	0,03	0,00	0,64
----------------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

Fonte: Ilustrações do trabalho.

Por fim, foram realizados novos cálculos para a determinação do rendimento médio:

Tabela 3: Dados do experimento, utilizadas na metodologia como modelo para a aplicação das fórmulas referentes ao cálculo do rendimento.

Cálculo do rendimento final					
Repetição	Massa Inicial de Pele úmida de Tilápia	Massa Inicial de Pele Desidratada de Tilápia	Massa obtida de Colágeno Hidratado	Massa obtida de Colágeno Desidratado	Rendimento de Colágeno em peso seco
1	20,00	7,84	12,00	6,59	84,03
2	20,20	7,92	11,90	6,53	82,50
3	20,30	7,95	12,40	6,80	85,54
4	20,15	7,90	13,20	7,24	91,74
5	20,10	7,88	13,70	7,52	95,45
Médias	20,15	7,90	12,10	6,64	84,02
Desvio Padrão	0,15	0,06	0,78	0,15	1,52

Fonte: Ilustrações do trabalho.

Inicialmente, foram colocados os valores da massa úmida de pele de tilápia utilizada na extração do colágeno (mpu) e a massa de colágeno úmido obtido na extração (mch). A massa real da pele de tilápia foi calculada através da equação, cujo resultado é expresso em gramas:

$$mpd = mpu - (mpu * (\bar{x}_{upt}/100))$$

Para calcular a quantidade real de colágeno obtida na extração (em gramas), foi definido o seguinte cálculo:

$$mcd = mch - (mch * (\bar{x}_{uc}/100))$$

E ao final, foi realizado o cálculo do rendimento a partir da expressão abaixo:

$$R(\%) = 100 * mcd/mpd$$

Com esses dados, foi possível calcular o rendimento médio, que é determinado a partir do cálculo da média (soma dos valores obtidos nas repetições

dividido pela quantidade de repetições), e o desvio padrão, que é calculado pela equação abaixo:

$$s = \sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2/n}$$

Onde s é o desvio padrão, xi é o valor da repetição, o x tracejado é a média e o n, o número de repetições.

5.4 Preparo dos hidrogéis

Para testar a função cicatrizante do colágeno isoladamente, foi necessário o desenvolvimento de uma formulação que viabilizasse a aplicação tópica do colágeno extraído da pele de tilápia até o sítio de ação que, neste contexto, é a pele rompida por um ferimento.

Foi realizado um estudo de pré-formulação com várias formulações de hidrogel para avaliar qual seria a mais adequada para incorporar o colágeno nas concentrações de 1% e 3%. Os produtos que foram desenvolvidos e as concentrações de cada excipiente estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 4: Formulações desenvolvidas ao longo do trabalho.

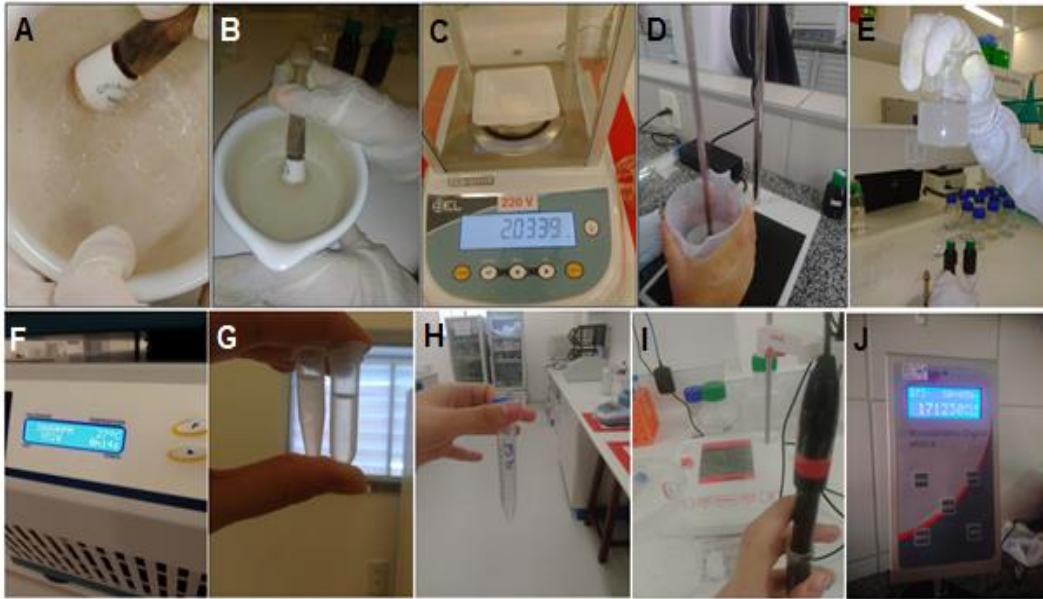
Formulações	Carboximetilcelulose	Propilenoglicol	Colágeno	Fenoxietanol	Água destilada
1	2%	6%	1%	0,5%	q.s.p. 100g
2	1,5%	6%	3%	0,5%	q.s.p. 100g
Base para formulação 1	2%	6%	0%	0,5%	q.s.p. 100g
Base para formulação 2	1,5%	6%	0%	0,5%	q.s.p. 100g

3	3%	10%	3%	0,5%	q.s.p. 100g
4	2%	10%	3%	0,5%	q.s.p. 100g
5	2%	10%	1%	0,5%	q.s.p. 100g
Base para formulação 3	2%	10%	0%	0,5%	q.s.p. 100g

Fonte: Dados da pesquisa.

As formulações foram preparadas da seguinte maneira: todos os componentes foram pesados antes da produção do hidrogel. O colágeno foi inserido primeiro no gral, para ser triturado, com o auxílio do propilenoglicol, que foi adicionado gradualmente. Isso formou uma mistura viscosa e levemente acinzentada. Em seguida, foi adicionado à mistura, a metade da água destilada acidificada até que foi formada uma solução homogênea. A carboximetilcelulose foi pulverizada sobre a mistura, mantendo-se apenas na superfície, sem agitação, durante 30 minutos. Finalizado o tempo, a formulação foi agitada vigorosamente até que desaparecesse todos os grumos de carboximetilcelulose e a solução adquirisse viscosidade e aspecto macroscópico de gel. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até o próximo dia, onde foram iniciados os testes de estabilidade.

Figura 9: Gravuras das etapas de fabricação dos hidrogéis. (A) Trituração do colágeno levigado pelo propilenoglicol, (B) Colágeno totalmente misturado ao propilenoglicol, (C) Pesagem da carboximetilcelulose, (D) Mistura da carboximetilcelulose à formulação sob forte agitação (600 rpm) até formar uma mistura homogênea e adquirir as características de um gel, (E) Hidrogel de colágeno já finalizado, (F) Centrifugação das amostras dos hidrogéis de colágeno a 3000 rpm, por 30 min, (G) Amostras dos hidrogéis após a centrifugação, sem fases separadas, (H) Amostra da formulação de colágeno 3% dissolvida (1g de hidrogel + 10 ml de água) para a aferição do pH, (I) Aferição do pH das amostras de hidrogéis, (J) Medida da viscosidade da formulação de colágeno 3% (F6).



Fonte: Dados da pesquisa.

5.5 Estudos de estabilidade preliminar

Um dia após a fabricação dos hidrogéis, uma alíquota de 1g de cada formulação foi colocada em um microtubo de 1,5ml para o teste de centrifugação, a 3000 rpm, por 30 minutos. Ao final foi verificado se houve ou não separação de fases nas amostras, sendo que o ideal para o hidrogel é que se mantenha homogêneo. A viscosidade foi medida com duas finalidades: estimar o comportamento reológico dos hidrogéis e avaliar durante duas semanas se esta propriedade se mantém estável. Para isso foi usado o viscosímetro de Brookfield (Marte Científica, São Paulo, Brasil), que mede a viscosidade através da tensão necessária para que o spindle (parte rotacional do equipamento) passe a girar.

5.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9.01 (GraphPad Software Inc.) Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão médio (EPM). Utilizou-se para a análise da maioria dos dados a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Nas comparações entre o dia 1 e as formulações do dia 7 ou 14, foi utilizado como pós-teste o Teste de Dunnet.

6 RESULTADOS

6.1 Extração do colágeno e determinação do rendimento médio

Os métodos de Nalinanon (2010) e Kim (2012) foram utilizados como referência teórica para o desenvolvimento de uma nova metodologia do Laboratório de Farmacologia da Cicatrização. Durante a adaptação foram consideradas as condições para tornar a extração de colágeno em escala industrial exequível. A duração do procedimento foi de três dias, e o colágeno extraído teve a aparência, boa uniformidade e foi facilmente incorporado às formulações dos hidrogéis.

As metodologias aplicadas no procedimento ocorreram de acordo com a temperatura preconizada pelo protocolo elaborado e em ótimas condições de limpeza, organização e qualidade dos reagentes. Os dados relacionados ao cálculo do rendimento estão descritos abaixo:

Tabela 5: Cálculo da quantidade de água e colágeno desidratado de duas extrações de colágeno.

Repetição	Placa vazia (P) (g)	Colágeno hidratado	Placa + colágeno hidratado	Placa + colágeno desidratado	Água	Colágeno desidratado
1	35,22	10,06	45,27	35,66	9,61	0,45
2	35,43	10,06	45,46	35,66	9,81	0,25

Fonte: Dados da pesquisa.

A tabela 5 representa os dados da terceira extração, em que 10g de amostra foram divididos em 5 liofilizações de 2g cada, para o cálculo do rendimento; na 6, contém dados da liofilização da pele de tilápia, que foi realizada para definir quanto da pele in natura é umidade e quanto é a massa real da pele; a 7 tem relação com o cálculo do teor percentual de umidade do colágeno e da pele de tilápia, e a 8, por fim, o cálculo do rendimento. Todos os cálculos obedecem às fórmulas estabelecidas na metodologia.

Tabela 6: Cálculo da quantidade de água e colágeno desidratado da terceira extração de colágeno. Teste em quintuplicata.

Amostra 3

Placa vazia	Colágeno úmido	P +C	Placa + colágeno desidratado	Água	Colágeno desidratado	Amostra	Percentual de umidade
30,98	2,02	32,98	31,23	1,75	0,27	1	86,77
31,35	2,09	33,44	31,48	1,96	0,13	2	93,95
31,17	2,02	33,19	31,31	1,87	0,15	3	92,76
30,90	2,04	32,94	31,01	1,92	0,11	4	94,39
30,90	2,06	32,96	31,04	1,92	0,14	5	93,33
31,06	2,04	33,10	31,21	1,89	0,16	Média	92,24
0,19	0,03	0,21	0,19	0,08	0,06	Desvio padrão	3,12

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 7: Cálculo da quantidade de água da pele de tilápia desidratada em quintuplicata.

Teor de água da pele da tilápia						
Amostra	Placa vazia (P)	Pele de tilápia úmida (p)	P +p (Pp)	Placa + pele de tilápia desidratada (Ppd)	Água (A) Pp-Ppd	Pele de tilápia desidratada (ptd) p-A
1	35,43	10,24	45,66	37,54	8,12	2,12
2	35,22	10,32	45,53	37,57	7,96	2,36
3	36,6	10,09	46,69	39,13	7,56	2,53
4	36,06	10,17	46,23	38,25	7,98	2,19
5	36,54	9,93	46,47	38,96	7,51	2,42
Médias	35,97	10,15	46,12	38,29	7,83	2,32
Desvio Padrão	0,63	0,15	0,50	0,75	0,27	0,17

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 8: Determinação do teor de umidade da massa de colágeno e da pele de tilápia.

Amostra	Teor de umidade do colágeno (%)	Amostra	Teor de água da pele de tilápia (%)
1	95,56	1	79,30
2	96,47	2	77,13
3	92,24	3	74,93
Média	94,76	4	78,47
Desvio padrão	2,23	5	75,63
		Média	77,09
		Desvio Padrão	1,84

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9: Cálculo do rendimento médio

Fonte: Dados da pesquisa.

Repetição	Massa Inicial de Pele úmida de Tilápia (mpu)	Massa Inicial de Pele Desidratada de Tilápia (mpd)	Massa obtida de Colágeno Hidratado (mch)	Massa obtida de Colágeno Desidratado (mcd)	Rendimento de Colágeno em peso seco (%)
1	20,65g	4,73g	26,57g	1,39g	29,45%
2	20,70g	4,74g	32,10g	1,68g	35,50%
3	20,26g	4,64g	24,13g	1,27g	27,26%
Médias	20,53	4,70	27,60	1,45	30,74
Desvio Padrão	0,24	0,05	13,71	0,21	4,27

6.2 Pré-formulação e estabilidade preliminar

A metodologia empregada na produção das formulações, desenvolvida no Laboratório de Cosmetologia da Universidade Federal do Ceará, permitiu a obtenção dos hidrogéis que incorporassem o colágeno na formulação. Essas modificações foram a modificação do pH da água para 1,2-2,0, a fim de manter o colágeno solubilizado durante e após o desenvolvimento dos hidrogéis, e o aumento do volume de propilenoglicol, que favoreceu a trituração mais adequada do colágeno em partículas menores, reteve água do meio, contribuindo para o aumento da viscosidade. Os dados referentes à concentração de colágeno das formulações, centrifugação, viscosidade, pH e análise macroscópica estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 10: Avaliação da estabilidade das formulações quanto ao pH, viscosidade, aspecto e a manutenção da homogeneidade após a centrifugação.

Código	Concentração (%)	pH	Viscosidade (cP)	Centrif.	Aspecto
F1	1	4,98±0,34 (g)	115466,33 ± 11369,46 (g)	Estável	Gel homogêneo e transparente
		5,11±0,28 (ta)	105312,44 ± 6234,29 (ta)		

		5,05±0,31 (e)	91020,17 ± 1591,80 (e)		
F2	3	5,19±0,05 (g)	96683,11 ± 26446,06 (g)	Separação do colágeno a partir do dia 7.	Gel amarelado e opaco.
		5,03±0,12 (ta)	46009,87 ± 4668,88 (ta)		
		5,13±0,06 (e)	22603,89 ± 13186,59 (e)		
Base 1	-	6,03±0,14 (g)	84101,53 ± 9948,56 (g)	Estável	Gel homogêneo e transparente
		6,25±0,33 (ta)	78607,56 ± 7051,53 (ta)		
		6,34±0,31 (e)	76427,11 ± 6494,32		
Base 2	-	6,26±0,19 (g)	35570,89 ± 4205,19 (g)	Estável	Gel amarelado e transparente.
		6,18±0,19 (ta)	34338,22 ± 3468,82 (ta)		
		6,18±0,12 (e)	32244,78 ± 2408,51 (e)		
F3	3	-	-	-	Gel endurecido, opaco e esbranquiçado. Descartado no primeiro dia.
F4	1	4,83±0,15 (g)	130570,22 ± 13733,97 (g)	Estável	Gel homogêneo e transparente

		4,82±0,16 (ta)	125540,67 ± 11216,42 (ta)		
		4,90±0,11 (e)	11467,17 ± 5799,44 (e)		
F5	3	5,65±0,16 (g)	164809,44 ± 5657,01 (g)	Estável	Gel homogêneo e transparente
		5,50±0,20 (ta)	151320,00 ± 3501,70 (ta)		
		5,59±0,12 (e)	135124,00 ± 8785,50 (e)		
Base 3	-	6,39±0,65 (g)	136931,33 ± 9115,81 (g)	Estável	Gel homogêneo e transparente.
		6,54±0,48 (ta)	126316,33 ± 4451,11 (ta)		
		6,61±0,38 (e)	115717,67 ± 4311,65 (e)		

Fonte: Dados da pesquisa. Os valores foram representados como média ± EPM. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey.

Através da tabela 4, foi possível avaliar quais formulações e bases são estáveis, a partir das médias dos resultados das aferições feitas em 14 dias. Foi verificado se uma formulação é mais ou menos estável a partir do número do erro padrão da média. A formulação 2, na variável viscosidade apresentou uma variabilidade maior durante o acondicionamento em estufa ($22603,89 \pm 13186,59$ cP) que a formulação 5 ($135124,00 \pm 8785,50$ cP), que contém a mesma concentração percentual de colágeno. A aferição do pH permitiu que fosse avaliada se a formulação estava como o pH dentro da faixa de especificação de pH semelhante ao da pele, que se encontra entre 4,6-5,8 (LEONARDI *et al.*, 2002). Todas as formulações de hidrogel, (exceto as formulações-base), obtiveram valores de pH dentro deste intervalo.

6.2.1 Centrifugação

Dentre os testes de estabilidade está a centrifugação. Os hidrogéis, após a centrifugação, não apresentaram segregação de excipientes ou do colágeno, mantendo o aspecto límpido. Uma vez finalizada a centrifugação e observado que não houve precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto ou coalescência, as amostras seguiram para os testes de pH e viscosidade.

Tabela 11: Resultados acerca dos testes de centrifugação. Foi verificada se houve alguma dispersão dos componentes do hidrogel, onde há um “x”, indica que não houve separação na formulação e um sinal de “certo”, indica que houve este fenômeno no decorrer do estudo. O método foi realizado no primeiro dia de testes.

Formulação	Houve segregação de algum componente da formulação?
	Dia 1
F1	X
F2	X
B1	X
B2	X
F4	X
F5	X

Fonte: Dados da pesquisa.

6.2.2 pH

Uma outra etapa da avaliação da estabilidade dos produtos foi o pH. Foram feitas aferições nos dias 1, 7 e 14, com o objetivo de testar a eficiência do hidrogel em se manter dentro da faixa de pH adequada para a aplicação na pele. Os resultados das aferições do pH estão disponíveis abaixo:

Tabela 12: Valores de pH aferidos nos dias 1, 7 e 14, em diferentes condições de armazenamento. A partir do dia 7, os valores são divididos em três linhas, sendo a primeira, referente às formulações armazenadas em geladeira (8°C); a segunda, armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e a terceira linha, na estufa (40°C).

Formulação	Dias de experimento		
	1	7	14
F1	5,66	4,56	4,71
		4,93	4,74
		4,83	4,66
F2	5,26	5,09	5,21
		4,93	4,90
		5,06	5,08
B1	5,77	6,10	6,23
		6,09	6,88
		6,83	6,42
B2	5,95	6,24	6,59
		6,05	6,55
		6,31	6,29
F4	5,10	4,81	4,57
		4,82	4,55
		4,88	4,53
F5	5,80	5,82	5,34
		5,60	5,34
		5,39	5,58

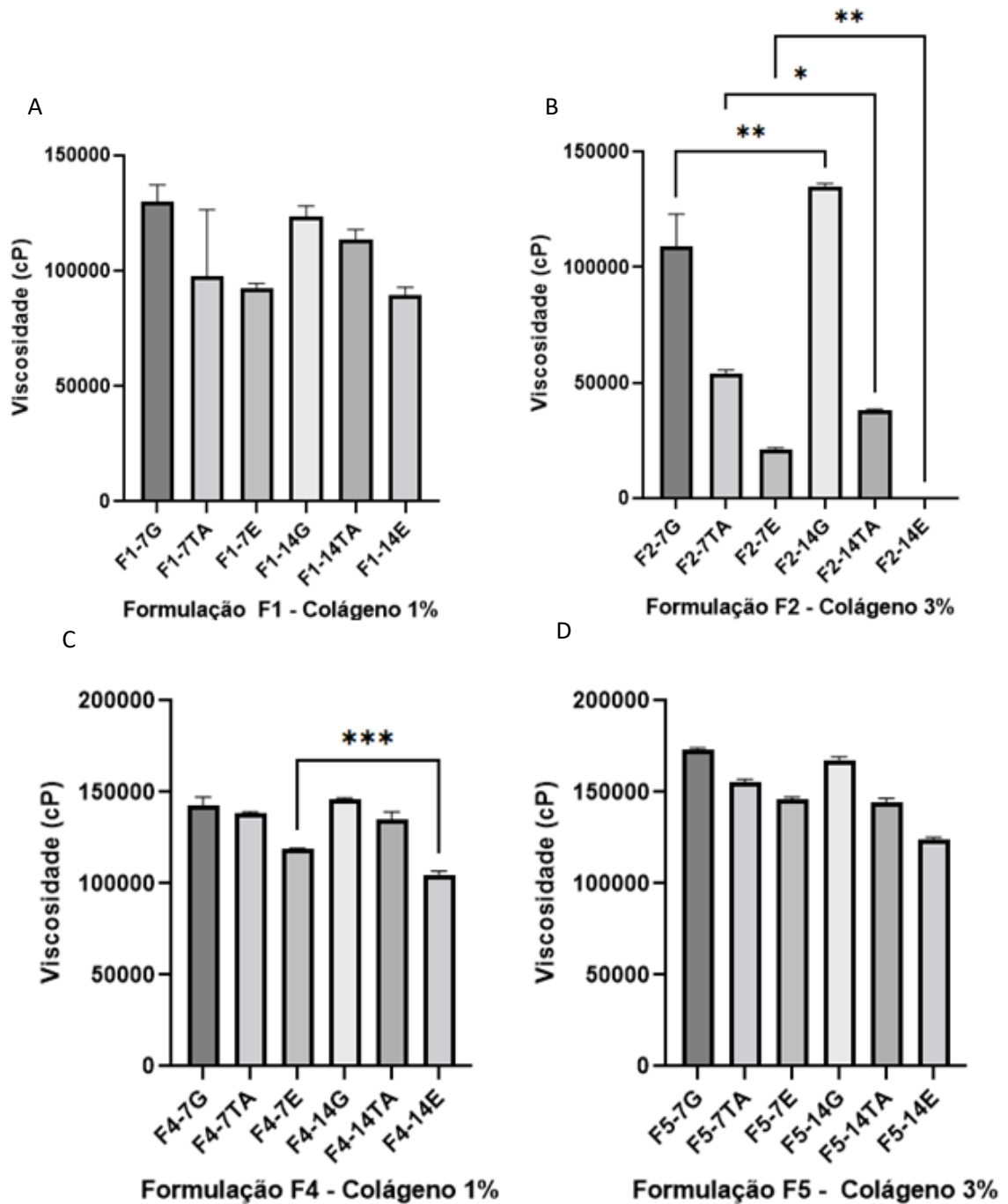
Fonte: Dados da pesquisa.

Nos valores individuais, foram observados valores abaixo de 4,6 nas três aferições do dia 14, na formulação 4 e acima de 5,8 nas formulações-base. Tendo em vista estes resultados, é imprescindível a avaliação das variações de pH mais adiante.

6.2.3 Viscosidade

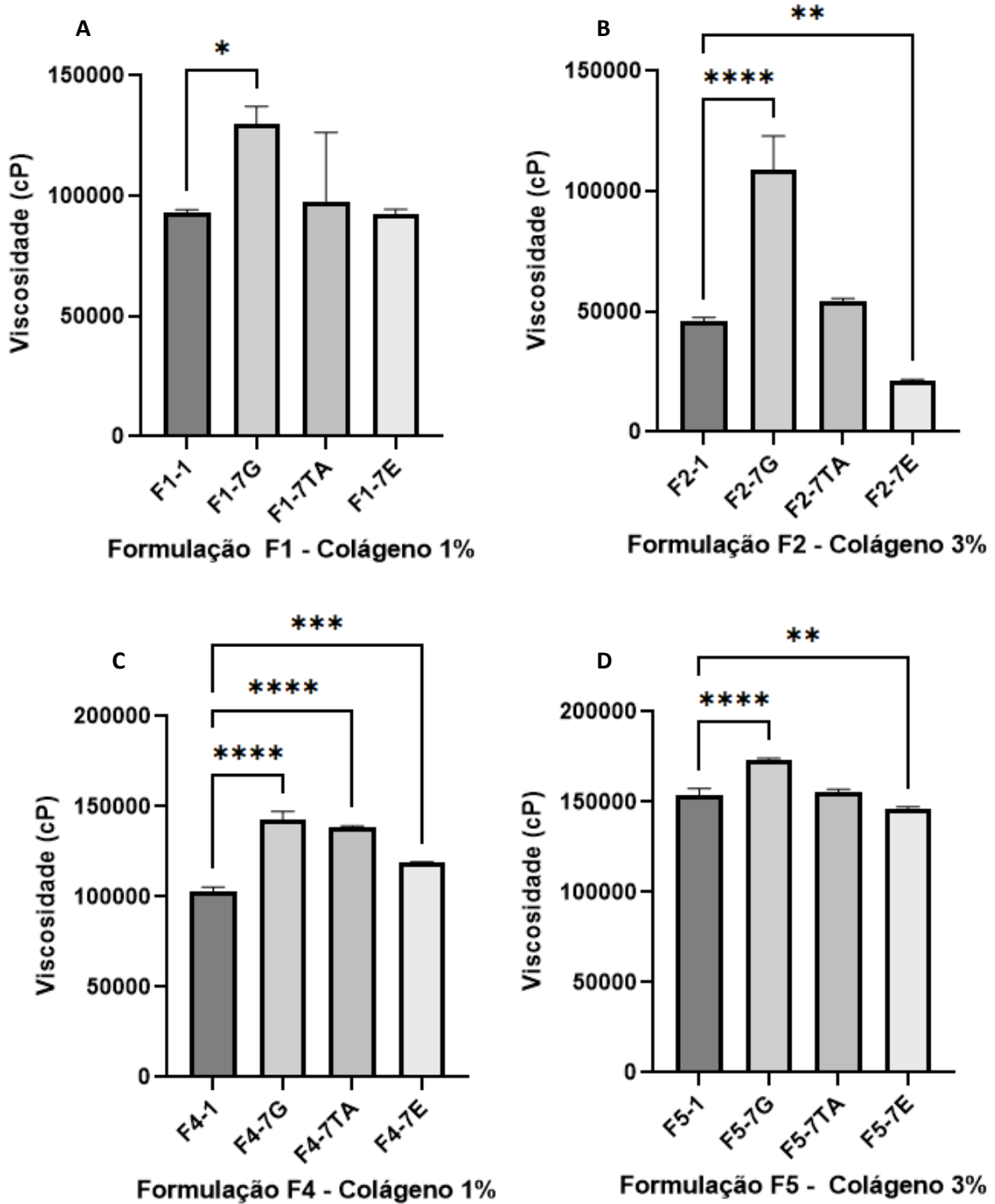
A viscosidade foi medida com o viscosímetro de Brookfield, a fim de verificar se houve modificações quanto ao tempo e à temperatura de armazenamento. Os resultados detalhados acerca da viscosidade estão representados nos gráficos a seguir:

Figura 10: As formulações 4 e 5 apresentaram maior estabilidade com o passar da semana.



Os hidrogéis foram avaliados durante 14 dias, nos dias 1, 7 e 14. Neste gráfico, foi comparada a viscosidade do dia 7 e dia 14, nas respectivas condições de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM. B. $**p=0,0014$ F2-7G vs F2-14G; $*p=0,0434$ F2-7TA vs F2-14TA; $**p=0,0086$ F2-7E vs F2-14E. C. $***p=0,0005$ F4-7E vs F4-14E. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

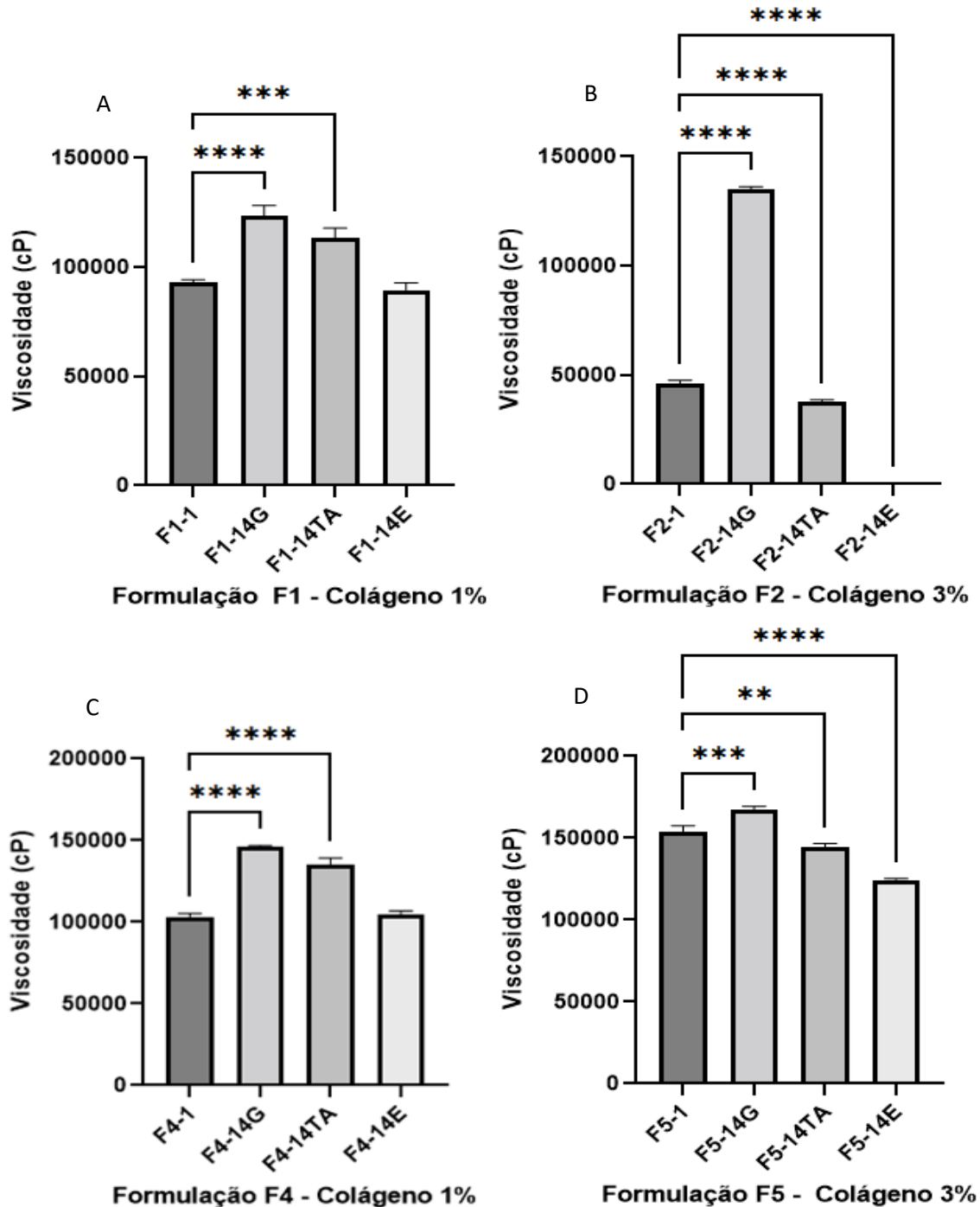
Figura 11: Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de diferentes temperaturas – dia 7.



Os hidrogéis foram avaliados durante 14 dias, nos dias 1, 7 e 14. Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre o dia 1, após a fabricação, e dia 7, em três condições de armazenamento. Os valores

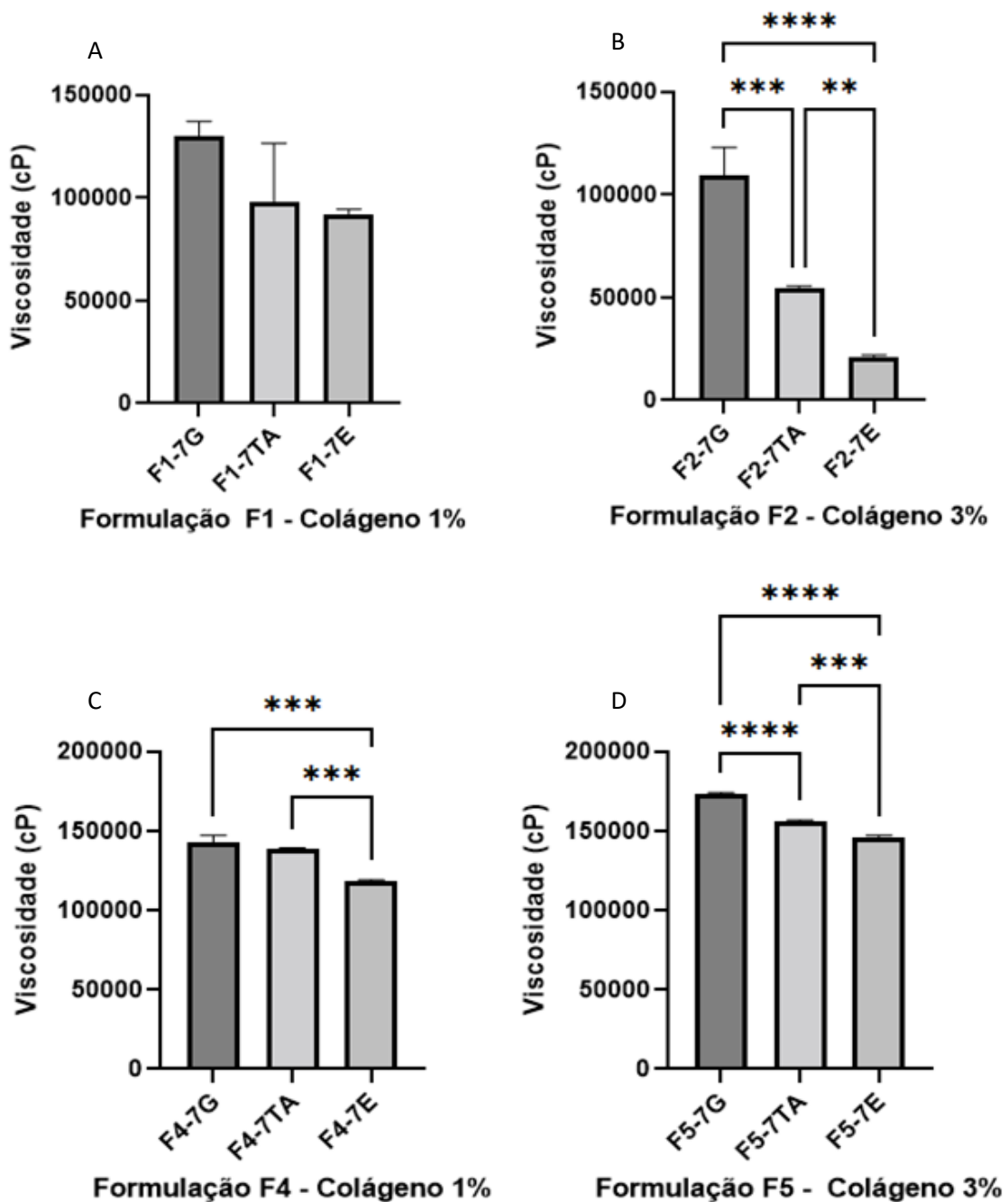
estão representados como média \pm EPM. A. $*p=0,0388$ F1-1 vs F1-7G; B. $****p<0,0001$ F2-1 vs F2-7G, $**p=0,0014$ F2-1 vs F2-7E. C. $****p<0,0001$ F4-1 vs F4-7G, $****p<0,0001$ F4-1 vs F4-7TA, $***p=0,0003$ F4-1 vs F4-7E. D. $p<0,0001$ F5-1 vs F5-7G, $**p=0,0035$ F5-1 vs F5-7E. ANOVA de uma via e Teste de Dunnet.

Figura 12: Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de diferentes temperaturas – dia 14.



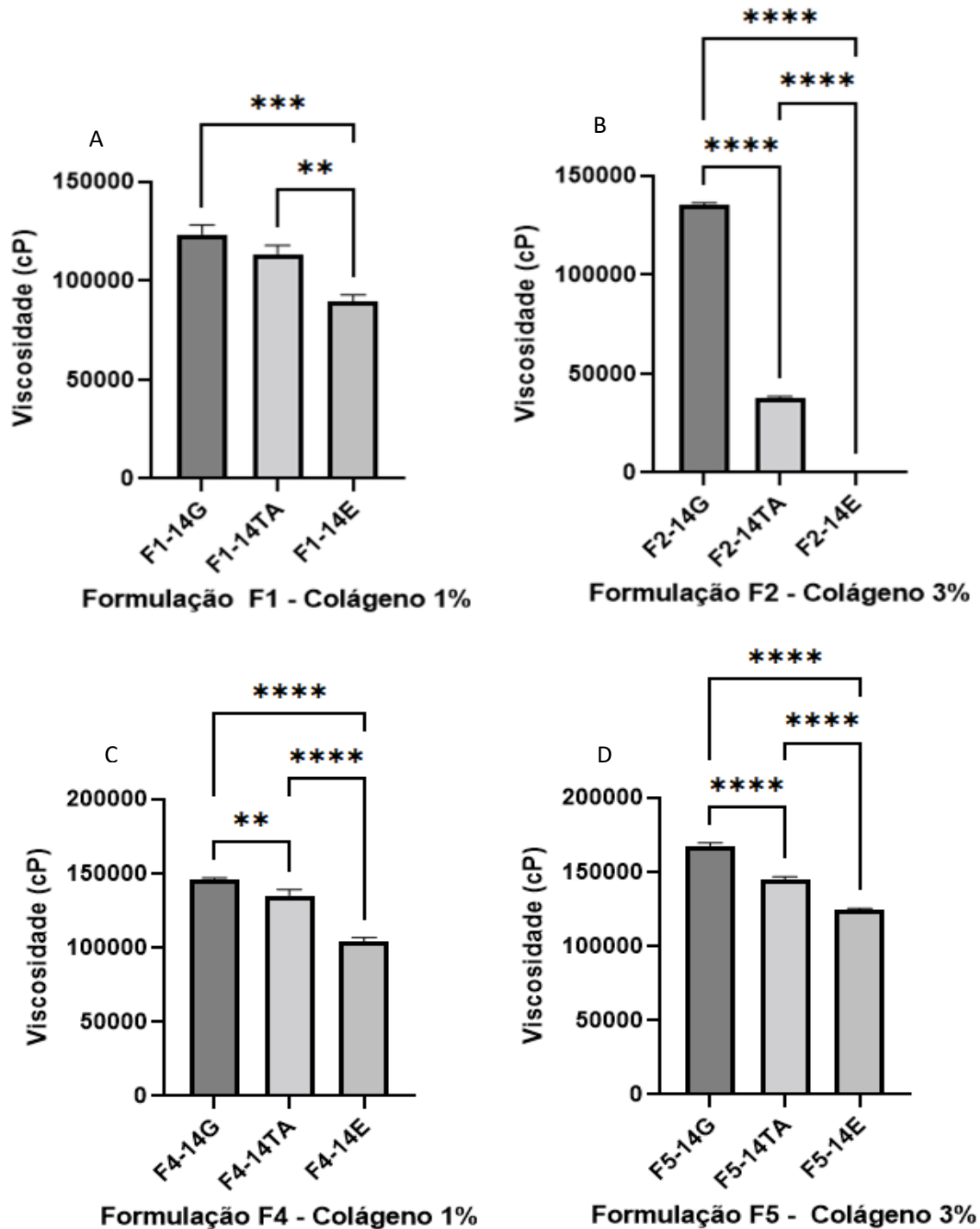
A viscosidade dos hidrogéis foi um dos parâmetros avaliados durante 14 dias, nos dias 1, 7 e 14. Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre o dia 1, após a fabricação, e dia 14, em três condições de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM.A. **** p <0,0001 F1-1 vs F1-14G, *** p =0,0004 F1-1 vs F1-14TA. B. **** p <0,0001 F2-1 vs F2-14G; F2-1 vs F2-14TA, F2-14E. C. **** p <0,0001 F4-1 vs F4-14G, F4-1 vs F4-14TA. D. *** p =0,0002 F5-1 vs F5-14G; ** p =0,0024 F5-1 vs F5-14TA, **** p <0,0001 F5-1 vs F5-14E. ANOVA de uma via e Teste de Dunnet.

Figura 13: Comparação entre as viscosidades no dia 7 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C).



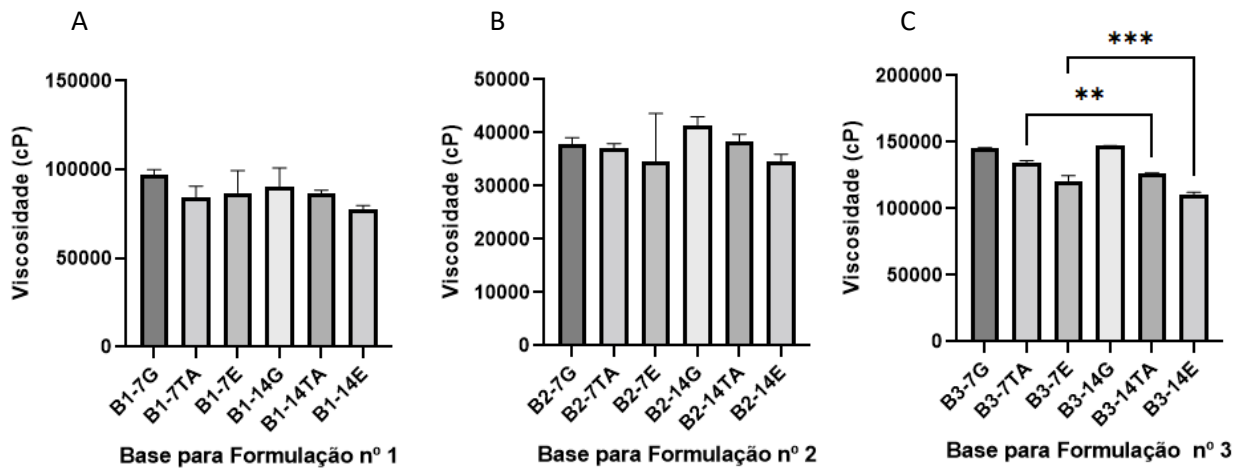
Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre três amostras de uma mesma formulação nas respectivas três temperaturas de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM. B. $***p=0,0004$ F2-7G vs F2-7TA $****p<0,0001$ F2-7G vs F2-7E, F2-7TA vs F2-7E. C. $***p=0,0001$ F4-7G vs F4-7E, $***p=0,0004$ F4-7TA vs F4-7E. D. $***p=0,0002$ F5-1 vs F5-14G; $**p=0,0024$ F5-1 vs F5-14TA, $****p<0,0001$ F5-1 vs F5-14E. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

Figura 14: Comparação entre as viscosidades no dia 14 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C).



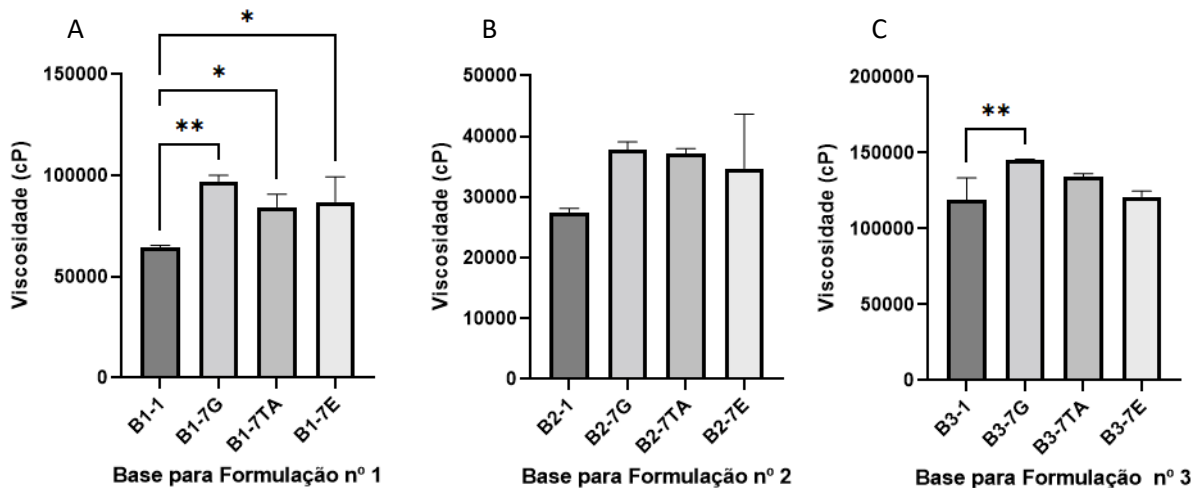
Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre três amostras de uma mesma formulação nas respectivas três temperaturas de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM. A. $***p=0,0002$ F1-14G vs F1-14E, $**p=0,0010$ F1-14TA vs F1-14E. B. $****p<0,0001$ F2-14G vs F2-14TA, F2-14G vs F2-14E, F2-14TA vs F2-14E. C. $**p=0,0067$ F4-14G vs F4-14TA, $****p<0,0001$ F4-14G vs F4-14E, F4-14TA vs F4-14E. D. $****p<0,0001$ F5-14G vs F5-14TA, F5-14G vs 14TA, F5-14TA vs F5-14E. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

Figura 15: Comparação da viscosidade das bases em relação ao tempo, nas mesmas condições de armazenamento.



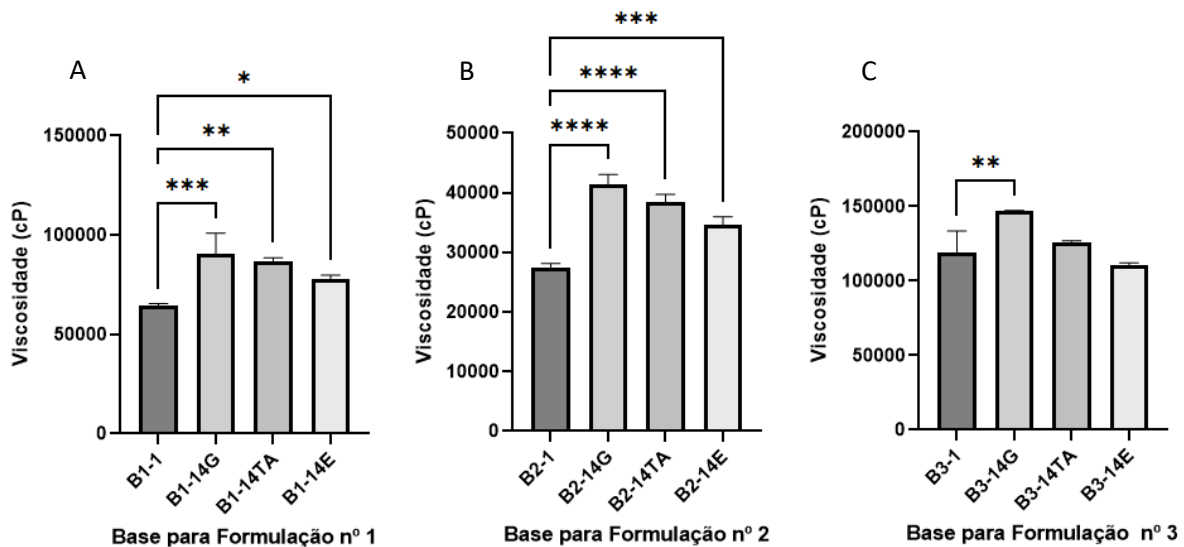
Nestes gráficos, foi comparada a viscosidade entre três amostras de bases para formulação nas respectivas três temperaturas de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM. C. $**p=0,0067$ F4-14G vs F4-14TA, $****p<0,0001$ F4-14G vs F4-14E, F4-14TA vs F4-14E. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

Figura 16: Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de base de diferentes temperaturas – dia 7.



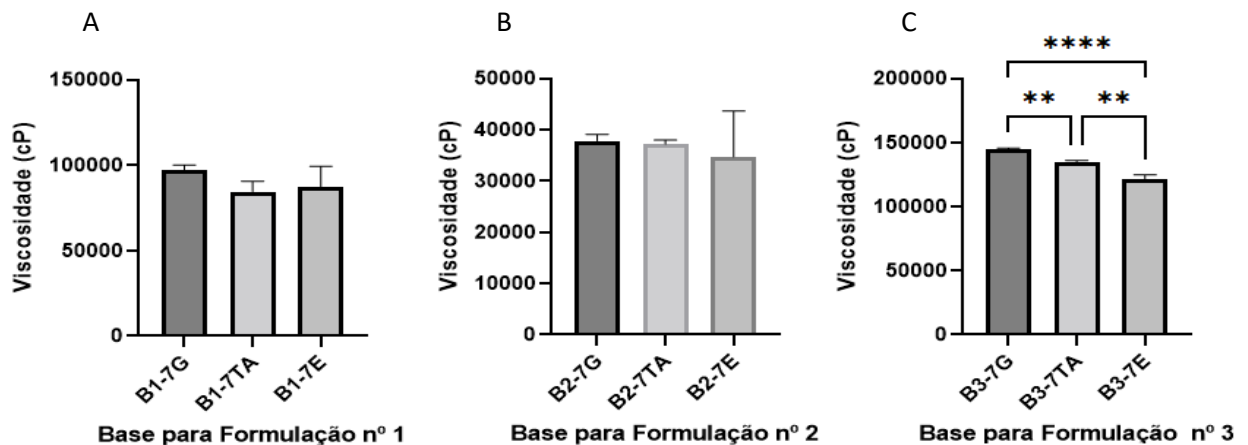
A viscosidade dos hidrogéis foi um dos parâmetros avaliados durante 14 dias, nos dias 1, 7 e 14. Neste gráfico, foi comparada a viscosidade das bases para hidrogéis entre o dia 1, após a fabricação, e dia 7, em três temperaturas de armazenamento: 8°C, 25°C e 40°C. Os valores estão representados como média \pm EPM. A. $**p=0,0013$ B1-1 vs B1-7G, $*p=0,0226$ B1-1 vs B1-7TA, $*p=0,0124$ B1-1 vs B1-7E. C. $**p=0,0074$ B3-1 vs B3-7G. ANOVA de uma via e Teste de Dunnet.

Figura 17: Comparação entre a viscosidade do dia 1 e das 3 amostras de base de diferentes temperaturas – dia 14.



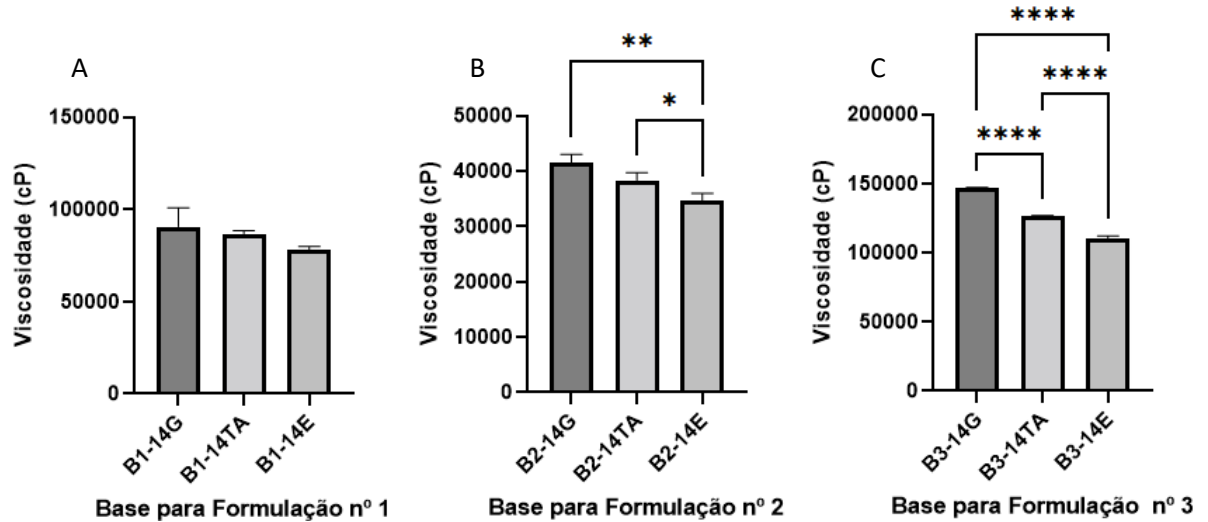
Durante 14 dias, foram avaliados três critérios no estudo de estabilidade preliminar. A viscosidade foi aferida nos dias 1, 7 e 14. Neste gráfico, foi comparada a viscosidade das bases para hidrogéis entre o dia 1, após a fabricação, e dia 14, em três temperaturas de armazenamento: 8°C, 25°C e 40°C. Os valores estão representados como média \pm EPM. A. $***p=0,0009$ B1-1 vs B1-14G, $**p=0,0024$ B1-1 vs B1-14TA, $*p=0,0401$ B1 vs B1-14E. B. $****p<0,0001$ B2-1 vs B2-14G, B2-1 vs B2-14TA, $***p=0,0004$ B2-1 vs B2-14E. C. $**p=0,0041$. ANOVA de uma via e Teste de Dunnet.

Figura 18: Comparação entre as viscosidades das bases no dia 7 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C).



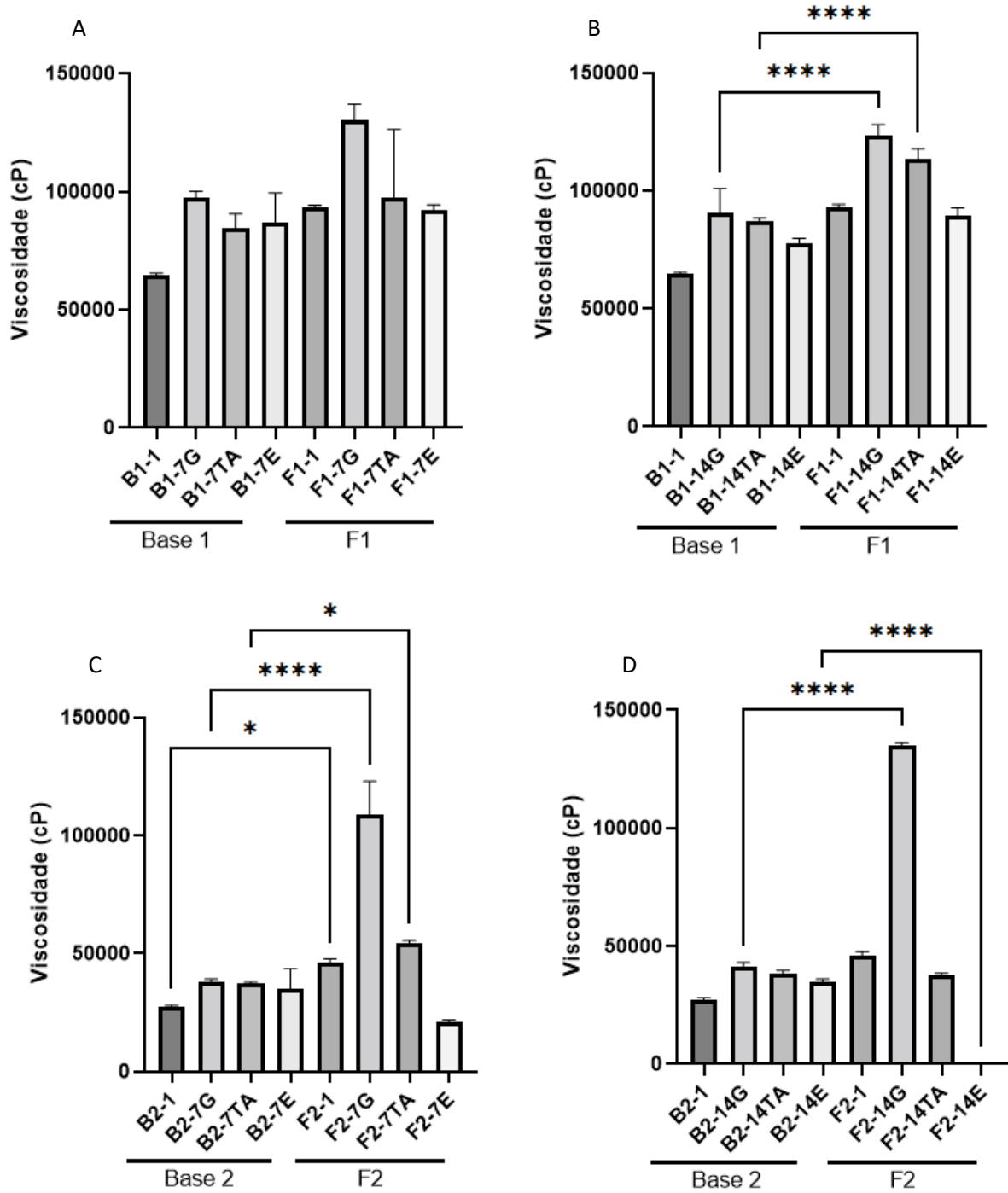
Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre três amostras de uma mesma base nas respectivas três temperaturas de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM. C. $**p=0,0034$ B3-7G vs B3-7E, $****p<0,0001$ B3-7G vs B3-7E, $**p=0,0015$ B3-7TA vs B3-7E. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

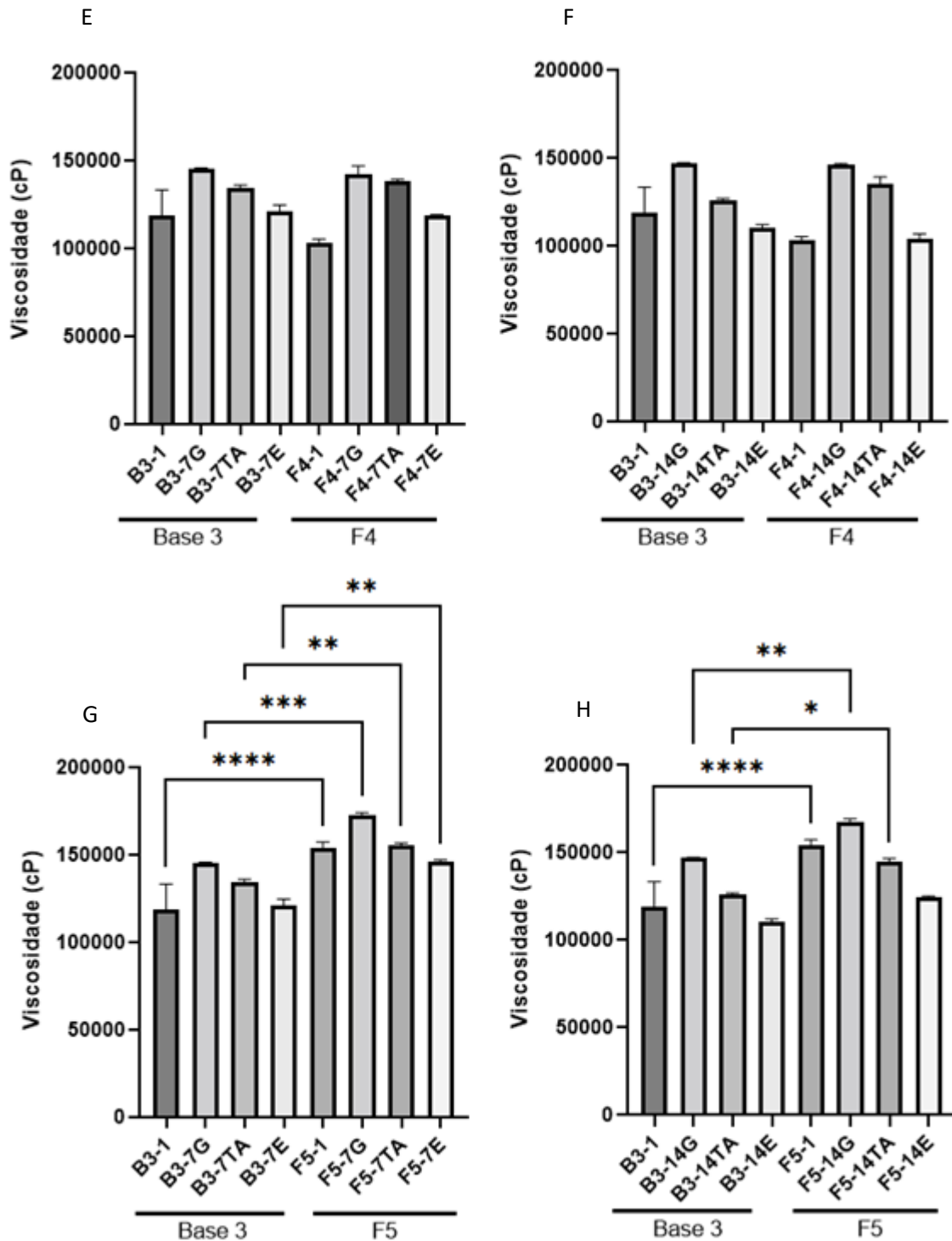
Figura 19: Comparação entre as viscosidades das bases no dia 14 em diferentes temperaturas de armazenamento (g – 8°C; ta – 25°C e “e” – 40°C).



Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre três amostras de uma mesma base nas respectivas três temperaturas de armazenamento. Os valores estão representados como média \pm EPM. B. $**p=0,0028$ B3-14G vs B3-7E, $*p=0,0454$ B3-14TA vs B3-14E. C. $****p<0,0001$ B3-14G vs B3-14TA, B3-14G vs B3-14E, B3-14TA vs B3-14E. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

Figura 20: Comparação entre as formulações e as respectivas bases que as constituem.





Neste gráfico, foi comparada a viscosidade entre a formulação com o colágeno e a respectiva formulação-base (sem colágeno), nos dias 7 e 14. Os valores estão representados como média \pm EPM. B. **** $p < 0,0001$ B1-14G vs F1-14G, B1-14TA vs F1-14TA. C. * $p = 0,0251$ B2-1 vs F2-1, **** $p < 0,0001$ B2-7G vs F2-7G, * $p = 0,0475$ B2-7TA vs F2-7TA. D. **** $p < 0,0001$ B2-1 vs F2-1, B2-14G vs F2-14G, B2-14E vs F2-14E. G. **** $p < 0,0001$ B3-1 vs F5-1, *** $p = 0,0003$ B3-7G vs F5-7G, ** $p = 0,0044$ B3-7TA vs F5-TA, ** $p = 0,0011$ B3-7E vs F5-7E. H. **** $p < 0,0001$ B3-1 vs F5-1, ** $p = 0,0055$ B3-14G vs F5-14G, * $p = 0,0148$ B3-14TA vs F5-14TA. ANOVA de uma via e Teste de Tukey.

7 DISCUSSÃO

7.1 A nova metodologia de extração de colágeno da pele de tilápia foi bem-sucedida, considerando a reprodutibilidade e a quantidade extraída.

Para pacientes com feridas crônicas extensas e pacientes queimados, seria ideal o uso dos aloenxertos, que são peles doadas de pacientes vivos ou já falecidos (ROWAN *et al.*, 2015). Porém, a disponibilidade de pele humana é insuficiente para atender a demanda destes pacientes (ALVES *et al.*, 2015; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017). Por isso, a melhor alternativa seria o desenvolvimento de novos tratamentos que substituam a necessidade do uso da pele humana, sendo mais econômicos e disponíveis (HERMANS *et al.*, 2014).

A proposta da pesquisa é o uso do colágeno como uma proteína bioativa para o uso em feridas crônicas, preferencialmente veiculada em formulações inovadoras que incorpore estas macromoléculas, e que tornem estas capazes de conferir propriedades benéficas à sua utilização como um agente terapêutico (BRANDELLI, 2012). Essa proposta baseia-se nos tratamentos bem-sucedidos da utilização da pele da tilápia como uma cobertura oclusiva em pacientes queimados (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017).

Já existem formulações, principalmente de cosméticos, que contêm colágeno hidrolisado na sua composição, e algumas delas também incluem outra molécula ativa, como a vitamina C para induzir a produção de novas fibras de colágeno na pele envelhecida (PULLAR *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Porém, o foco deste trabalho é desenvolver produtos que utilizem o colágeno, extraído da pele de tilápia através de uma metodologia inovadora desenvolvida no Laboratório de Farmacologia da Cicatrização, como um princípio ativo isolado para o tratamento de feridas crônicas, ou seja, incorporado a uma formulação com função de medicamento.

O método que foi desenvolvido neste trabalho teve como ponto de partida as metodologias utilizadas por KIM em 2012 e NALINANON, em 2010. A metodologia foi adaptada às condições do laboratório e elaborada para que seja possível uma futura extração em larga escala. No protocolo proposto por KIM (2012), o rendimento do colágeno solubilizado em ácido acético, SEM A APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DA SONICAÇÃO, FOI DE 20%. NALINANON (2010), obteve o percentual de 30,3% de colágeno solubilizado em ácido acético (CSA), sem tratamento enzimático. Neste trabalho, em que foi realizada a extração com solução

de ácido clorídrico (HCl) de pH = 1,2 o rendimento médio obtido foi de 34,48%, o que significa que o último método, apenas com a solubilização em ácido, recuperou quantidades maiores de colágeno, considerando que este foi o que teve menor tempo gasto e foi utilizado insumos mais baratos, o que dispensou o uso da enzima ou outro método de maior consumo de energia como a sonicação, por exemplo.

7.2 As formulações 4, 5 e a formulação base apresentaram melhor desempenho nos testes de estabilidade.

A viscosidade dos hidrogéis é um parâmetro crucial por determinar como será a espalhabilidade, o aspecto sensorial e absorção cutânea. Produtos que escoam facilmente podem ter a ação prejudicada, por não reter no local toda a dose necessária para o tratamento (MOHAMMED, 2001). A hidratação promovida pelo hidrogel não é devido ao uso de excipientes oleosos, e sim, pelas propriedades físico-químicas da carboximetilcelulose. O propilenoglicol, assim como a carboximetilcelulose, é uma molécula higroscópica, isto é, absorve bastante água, e quantidades maiores deste componente na formulação retém a água por mais tempo no local onde é aplicado (HOARE e KOHANE, 2008).

Os hidrogéis são formulações de comportamento pseudoplástico, ou seja, à medida que é aumentada a tensão de cisalhamento sobre a forma farmacêutica, as partículas presentes na mistura são ordenadas na direção da força empregada sobre a formulação e, deste modo, a viscosidade diminui (YANG e DU, 2019). O comportamento pode ser descrito através de um gráfico com as variáveis viscosidade x tensão de cisalhamento, exibindo uma curva descendente. O reômetro é o aparelho ideal para definir o comportamento reológico da formulação, porém, por não estar disponível no local do experimento, foi necessário o uso do viscosímetro de Brookfield para verificar como a formulação se comportava em relação ao aumento da força aplicada durante as aferições.

Nos testes de viscosidade foram aplicadas velocidades de 3, 6 e 12 rpm em triplicata para cada velocidade e foi observado que a cada aumento de velocidade, a viscosidade era reduzida, confirmando o comportamento pseudoplástico. Formulações mais viscosas, em especial as formulações 4 e 5 armazenadas em geladeira, não puderam ser lidas em velocidades de 6rpm e 12rpm, porque a força para fazer o *spindle* rotacionar (torque) nestes casos foram superiores a 100%, o que

diminui a confiabilidade dos resultados emitidos e fazia o viscosímetro parar a rotação e a leitura dos dados. A faixa de confiabilidade de leitura está entre 10-100% (dados do fabricante). Visto que a leitura de todos os dados foi possível a 3rpm, estes dados foram utilizados para redigir os gráficos comparativos em relação à variação de temperatura (figuras 11, 12, 16 e 17), entre os dias testados (figuras 8, 9, 10, 13, 14 e 15) e em relação à formulação base (figura 18).

As formulações 4 e 5 foram aprovadas após os 14 dias de testes de estabilidade preliminar, por manterem as características macroscópicas do gel intactas. O colágeno não se separou dos excipientes e a variação do pH permaneceu insignificante durante todo o período de teste. A formulação 2 foi reprovada neste teste de estabilidade devido à perda acentuada de viscosidade (vide figuras 8, 10, e 12). Nenhuma formulação testada em laboratório suportou 5% de colágeno, por esta razão, foram continuados apenas os testes com 1% e 3%.

O aumento da porcentagem de CMC na formulação de colágeno 3%, de 1,5% (F2) para 2% (F5) foi bastante salutar. O aumento do CMC na formulação deixa a solução mais viscosa e mais estável (BENSLIMANE *et al.*, 2016) e o propilenoglicol em grande quantidade possibilitou a trituração e a dissolução completa da massa úmida de colágeno. O CMC é higroscópico, absorve a água do colágeno úmido e por isso a viscosidade fica ainda maior se comparada às outras formulações já estudadas.

Isto é devido ao fato de que a carboximetilcelulose é um polímero hidrossolúvel derivado da celulose, que é constituída por cadeias ligadas a grupos carboxilas (BAJPAL *et al.*, 2008). O pKa desse material é em torno de 4,6 e valores de pH de soluções de CMC acima de 4,6 fazem com que os grupos carboxila se dissociem, formando carboxilatos. Esses grupamentos têm a mesma carga aniônica e a solução intumescce, formando o gel, e à medida que o pH se distancia de 4,6 a viscosidade aumenta bastante (LIMA, 2014). A composição do polímero, as cadeias hidrofóbicas e a densidade das ligações cruzadas (crosslinks) também são fatores que influenciam na formação e viscosidade do gel (AGUILAR *et al.*, 2007). A principal vantagem de utilizar a carboximetilcelulose para o preparo de um hidrogel cicatrizante é a biocompatibilidade, pelo alto teor de água captada pelos hidrogéis de CMC e pela similaridade físico-química do hidrogel com a matriz extracelular do organismo (HOARE, 2008). O aumento do propilenoglicol melhorou a solubilidade do colágeno,

atuando como um levigante – auxilia na trituração ao umidificar a massa de colágeno – e um agente molhante, aumentando o ângulo de contato entre sólido e líquido, mantendo o colágeno disperso na formulação (AULTON, 2016).

7.3 A carboximetilcelulose e o propilenoglicol influenciam na viscosidade, porém, o papel do colágeno neste parâmetro permanece inconclusivo.

O colágeno assume um comportamento reológico anormal na forma isolada (LI et al, 2016) e nas formulações de colágeno, o que dificulta a determinação do papel do colágeno na viscosidade. Uma variedade de fatores influencia no comportamento reológico anormal do colágeno: a adsorção do colágeno pelo vidro das vidrarias, o pH, a força iônica, forças intermoleculares e temperatura (HEINEN, 2012). A adição de NaOH como pré-tratamento para o colágeno antes da extração auxilia a evitar a perda por adsorção ao vidro, mas enfraquece a viscosidade induzida pelo colágeno ao enfraquecer as ligações de hidrogênio proteína-líquido e proteína-proteína (RONZON,1987).

A temperatura apresenta o mesmo comportamento nas soluções de colágeno exposta a temperatura baixa (4°C) e alta (25°C). A resposta sugerida foi que as moléculas de colágeno dissolvidas em solução tendem a se associar em altas temperaturas devido ao aumento das interações intermoleculares hidrofóbicas entre as moléculas de colágeno, formando agregados (LI et al, 2016). Em baixas temperaturas, a força intermolecular predominante são as ligações de hidrogênio e a solvatação, o que mantém o colágeno dissolvido e doando viscosidade à solução. Portanto, o colágeno induz viscosidade em temperaturas altas e baixas, por forças intermoleculares predominantes diferentes.

Nas aferições dos valores do pH, percebeu-se que quanto maior a quantidade de colágeno na formulação, menor a variação de pH ao longo do estudo (vide a tabela 3). A explicação mais plausível seria a que os aminoácidos contêm grupamentos aminoterminais e carboxiterminais que interagem com o conteúdo iônico das soluções onde estão dissolvidos. Quando o meio está muito ácido, há uma grande oferta de íons H⁺ na mistura, que interagem com os grupamentos, tornando estes protonados e solubilizados em água (MONTGOMERY *et al.*, 1997). Com o aumento do pH, a quantidade de íons H⁺ disponíveis diminuem e os aminoácidos se dissociam, liberando primeiramente o íon, porque as ligações π , presentes no grupamento

carboxila, são menos estáveis que as ligações σ que constituem o grupamento amina (OLIVEIRA e ROSA, 2015). Ao atingir o ponto isoelétrico, a carga da proteína é nula, as moléculas de colágeno se tornam insolúveis e precipitam. (LEHNINGER, 2000).

No caso do pH das formulações, não há perda nem aumento brusco de pH porque o colágeno ainda está dissolvido, abaixo do ponto isoelétrico e interagindo com os íons H^+ dissociados na solução extrativa, oriundos do HCl. A base tem variação alta entre o maior e o menor valor de pH porque, sem a proteína, não há o “efeito tampão” que protege a formulação contra as discrepâncias nos valores de pH.

Resumindo, o trabalho sugere que o colágeno, além de ser o princípio ativo, é um agente tamponante e promove o ajuste de viscosidade, ainda que de forma indeterminada. São necessários estudos mais aprofundados para elucidar o comportamento do colágeno em formulações cosméticas, visto que aparentemente há mais de uma função além de ser o Insumo Farmacêutico Ativo dos hidrogéis.

7.4 Análise das propriedades organolépticas no estudo de estabilidade

No estudo de estabilidade preliminar também foram avaliadas a permanência de características como a cor, odor e aspecto dos hidrogéis, de acordo com o Manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicado em 2020. Quanto ao aspecto, todas as amostras se mantiveram homogêneas até o dia 7, quando a formulação 2, que continha 3% de colágeno, 1,5% de carboximetilcelulose e 6% de propilenoglicol se desfez, modificando a forma farmacêutica de semissólida para líquida e apresentando fragmentos de colágeno dispersos. Além disto, a formulação 2 também foi reprovada quanto à cor, que era transparente e se tornou opaca e amarelada. Nenhuma formulação sofreu modificações no odor. Testes como o doseamento, determinação do peso e da densidade serão desenvolvidos futuramente, sob as normas preconizadas pela Farmacopeia Brasileira.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formulações de hidrogel 4 e 5, que contém colágeno nas concentrações de 1 e 3%, respectivamente, apresentaram estabilidade aceitável, sem separação de fases nem grandes perdas de viscosidade, e o pH se manteve estável nas formulações com colágeno durante o estudo de estabilidade preliminar, sugerindo que o colágeno funciona como um tampão ao interagir com as cargas da solução, evitando

assim, quedas bruscas no pH. O colágeno extraído através da metodologia desenvolvida no laboratório foi reprodutível, em boa quantidade e se dissolveu facilmente no preparo dos hidrogéis. É preciso realizar o estudo de estabilidade de longa duração a fim de estabelecer o prazo de validade e determinar se há necessidade de inserir ou substituir algum excipiente na formulação.

9 CONCLUSÃO

O protocolo desenvolvido neste trabalho para a extração do colágeno da pele de tilápia apresentou excelente rendimento e reprodutibilidade. A metodologia é inovadora, consiste em reagentes de fácil obtenção, simples de executar, exige menos tempo e é possível escalonar para uma produção industrial em larga escala.

A base para formulação nº 3 foi eficiente em manter o colágeno disperso, de forma estável, nas concentrações de 1% e 3%, e isso se deve graças ao aumento da quantidade de propilenoglicol de 6% para 10%. O propilenoglicol é um agente umectante, que uma vez adicionado à formulação, melhorou a dispersividade das partículas de colágeno, fazendo com que estas permanecessem solubilizadas no hidrogel.

Deste modo, os resultados indicam que os hidrogéis desenvolvidos no trabalho foram aprovados no teste de estabilidade preliminar, permitindo que sejam continuados estudos de toxicidade, estabilidade de longa duração, e a avaliação do efeito cicatrizante potencial da proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, J. M., SOPKO, N. A., MILNER, S. M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*, Salt Lake City, v. 28, n. 2020, p. 1-10, 2020.

ALVES, A. P. N. N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Fortaleza, v. 14, n. 3, p. 203-210, out./dez. 2015.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view>> Acessado em: 20 de setembro 2021.

ARMSTRONG AW, READ C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. **JAMA**, London, v. 323, n. 19, p.1945-1960, may/2020.

ASHOURI, F. *et al.* Macrophage polarization in wound healing: role of aloe vera/chitosan nanohydrogel. **Drug Delivery and Translational Research**, Khorramabad, v. 9, n. 6, p. 1027-1042, dez/2019.

AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. Ed. São Paulo: Elsevier, 2016. 855p.

AZIZ, Z. A. A *et al.* Role of Nanotechnology for Design and Development of Cosmeceutical: Application in Makeup and Skin Care. **Frontiers in Chemistry**, Kuala Lumpur, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2019.

BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, jan./mar. 2005.

BASSO, T. R. *et al.* Extração e Caracterização de Colágeno Obtido de Peles do Processamento de Tilápia. **Anais do III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência**, Toledo, v. 1, n. 1, p. 192-196, out. 2013.

BENSLIMANE, A. *et al.* Thermal gelation properties of carboxymethyl cellulose and bentonite-carboxymethyl cellulose dispersions: Rheological considerations. *Applied Clay Science*, Mira-Bejaia, v. 132, n. 1, p. 702-710, 2016.

- BOATENG, J.S. et al. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Glasgow, v. 97, n. 1, p. 2892–2923, 2008.
- BOER, M. et al. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. **Adv Dermatol Allergol**, Szczecin, v. 23, n. 1, p. 1-5, 2016.
- BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, Porto Alegre, v. 12, n. 8, p. 731-741, may/2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **RDC nº 308, de 6 de novembro de 2019**. Brasília, 2019.
- BRODSKY, B., RAMSHAW, J.A.M. The Collagen Triple-Helix Structure. **Matrix Biology**, New Jersey, v. 15, n. 1997, p. 545-554, 1997.
- BYERS, Peter H.; MURRAY, Mitzi L. Heritable Collagen Disorders: The Paradigm of the Ehlers–Danlos Syndrome. **Journal of Investigative Dermatology**, Washington, v. 132, n. 3, p. 6-11, nov. 2012.
- CAMPOS, Antonio Carlos Ligocki; BORGES-BRANCO, Alessandra; GROTH, Anne Karoline. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 51-58, mai./jun. 2008.
- CASTRO, M.C. et al. Reduction in the 2020 Life Expectancy in Brazil after COVID-19. **medRxiv**, Boston, v. 1, n. 1, p. 1-30, 2021.
- CAVALLIERI, R.C.D. **Avaliação econômica e de desempenho de duas linhagens de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com duas rações comerciais, criadas em gaiolas no Rio Iguaçu – reservatório de Salto Caxias**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, p.85. 2016.
- CHAUDRY, Z. F. et al. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 40-46, 1997.
- CHAUDRY, Z. F. et al. Preparation and characterization of anionic collagen by selective hydrolysis of internal carboxamide groups. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 40-46, abr./jun. 1997.

CHI, C. et al. Antioxidant and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Spanish Mackerel Skin as Influenced by Average Molecular Weight. **Molecules**, Zhoushan, v. 19, n. 8, p. 11211-11230, mai./jul. 2014.

COSTA, S.F. Desordens no metabolismo de aminoácidos. Dissertação (**Mestrado em Ciências Farmacêuticas**) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 76p. 2013.

DHIVYA, Selvaraj; PADMA, Viswanadha Vijaya; SANTHIN, Elango. Wound dressings – a review. **Biomedicine**, Tamil Nadu, v. 5, n. 4, p. 24-28, dez. 2015.

DIAS, M.T *et al.* Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertil Steril.**, Fortaleza, v. 112, n. 1, p. 174-176, may/2019.

EBERHARDT, T. D. *et al.* CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: ANÁLISE DAS TENDÊNCIAS EM TESES E DISSERTAÇÕES. **Revista de Enfermagem da UFSM**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 387-395, jun./2015.

ELBIALY, Z. I. *et al.* Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and α -SMA genes expression. **BMC Vet Res**, Kafr el-Sheikh, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2020.

FRANCO, Diogo; GONÇALVES, Luiz Fernando. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 203-206, ago./out. 2007.

GENSEL, John C.; ZHANG, Bei. MACROPHAGE ACTIVATION AND ITS ROLE IN REPAIR AND PATHOLOGY AFTER SPINAL CORD INJURY. **Brain Res.**, Lexington, v. 2015, n. 1619, p. 1-11, jan./2015.

GHICA, M.V. et al. Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels. **Molecules**, Bucareste, v.21, n. 786, p. 1-17, 2016.

GIMENEZ, B. *et al.* Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, Madrid, v. 19, n. 2005, p. 941-950, set/2004.

GOMES, F. S. L; CARVALHO, Daclé Vilma; LIMA, E. D. R. D. P. TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS COM COBERTURAS OCLUSIVAS: subtítulo do artigo. **Rev. Min. Enferm**: subtítulo da revista, Belo Horizonte, v. 13, n. 1, p. 19-27, mar/2009.

GONÇALVES, G. R. et al. Benefícios da ingestão de colágeno para o organismo humano. **Revista Eletrônica de Biologia**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 190-207, mar. 2015.

GONZÁLEZ, A.C.O *et al.* Wound healing - A literature review. **An Bras Dermatol**, Salvador, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

GUPTA, A. *et al.* A Preclinical Study of the Effects of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaf Extract on Cutaneous Wound Healing in Albino Rats. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, Delhi, v. 4, n. 2, p. 88-92, abr./2014.

HALL, C. *et al.* Pathophysiologic Mechanisms and Current Treatments for Cutaneous Sequelae of Burn Wounds. **Comprehensive Physiology**, Houston, v. 8, n. 1, p. 371-405, 2018.

HÄNEL K. H *et al.* Cytokines and the skin barrier. **Int J Mol Sci**. Aachen, v. 14, n. 4, p. 6720-6745, mar./2013

HE, R. *et al.* IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. **Molecular Immunology**, Guangzhou, v. 90, n. 2017, p. 42-49, jun./2017.

HEBEISH, A. *et al.* Development of CMC hydrogels loaded with silver nanoparticles for medical applications. **Carbohydrate Polymers**, Cairo, v. 92, n. 2013, p. 407-413, 2013.

HEINEN, M. *et al.* Viscosity and diffusion: crowding and salt effects in protein solutions. **Soft Matter**, v. 8, n 1, p. 1404-1419, 2012.

HERMANS MH. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? **Burns**. Newtown, v. 40, n. 3, p. 408-415, may/2014.

HERNÁNDEZ, E. N. M. Desenvolvimento de matriz extracelular descelularizada (Scaffold) de pele de tilápia como novo biomaterial para aplicação em medicina regenerativa. 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

HESKETH, M. *et al.* Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, Brisbane, v. 18, n. 1545, p. 1-10, jul./2017.

KIM, H. K. et al. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. **Fish Science**, Seongnam, v. 2012, n. 78, p. 485-490, ago./fev. 2012.

KOARE, T.R., KOHANE, D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 2008, p. 1993-2007, 2008.

KOH, Timothy J.; DIPIETRO, Luisa Ann. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Chicago, v. 13, n. 23, p. 1-12, jul./2011.

KOTWAL, Girish J; CHIEN, Sufan. Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. **Results Probl Cell Differ.**, Louisville, v. 2017, n. 62, p. 353-364, mar./2018.

KRZYSZCZYK, P. *et al.* The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. **Frontiers in Physiology**, Columbus, v. 9, n. 419, p. 1-22, mai./2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N; ASTER, J.C. **Robbins e Cotran, Bases. Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 1592p.

LAU, C.S. *et al.* Evaluation of decellularized tilapia skin as a tissue engineering scaffold. **J Tissue Eng Regen Med**, Singapura, v. 13, n. 10, p. 1779-1791, sep./2019.

LAWTON, S. *et al.* Skin 1: the structure and functions of the skin. **Nursing Times**, Rotherham, v. 115, n. 12, p. 30-33, 2019.

LAZARUS, G.S. *et al.* Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. **Arch Dermatol**, Davis, v. 130, n. 4, p. 489-493, 1994.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LI, Y., et al. Viscosity of Collagen Solutions: Influence of Concentration, Temperature, Adsorption, and Role of Intermolecular Interactions. **Journal of Macromolecular Science**, Jinan, v. 53, n. 5, p. 893-901, 2014.

LIMA, B. V. Avaliação das propriedades físico-químicas de sistemas à base de carboximetilcelulose e poli (N-isopropilacrilamida) em soluções aquosas para aplicação na indústria de petróleo. **Tese (Doutorado em Química)** – Centro de

Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 184p. 2014.

LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Fortaleza, v. 16, n. 1, p. 10-17, jun. 2017.

LIMA-JUNIOR, E. M. *et al.* Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical Case Reports**, Fortaleza, v. 2019, n. 6, p. 1-4, mar./2019.

LIMA-JUNIOR, E. M. *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev. Min. Enferm**, Fortaleza, v. 165, n. 1, p. 10-17, mar./2017.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical Case Reports**, Fortaleza, v. 6, n. 1, p. 1-4, 2019.

LIMA-VERDE, M.E.Q. *et al.* Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. **Acta Histochem.**, Fortaleza, v. 123, n. 6, p. 1-8, sep./2021.

LIN, M. P. *et al.* Delivery of plasmid DNA expression vector for keratinocyte growth factor-1 using electroporation to improve cutaneous wound healing in a septic rat model. **Wound Rep Reg**, Baltimore, v. 2006, n. 14, p. 618-624, jun/2006

MAHBOOB, Shahid. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales, and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. **Journal of Food, Science and Technology**, Riad, v. 52, n. 7, p. 4296-4305, ago./set. 2014.

MANDELBAUM, Samuel Henrique; SANTIS, É. P. D; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, ago/2003.

MANDELBAUM, Samuel Henrique; SANTIS, Érico Pampado Di; MANDELBAUM, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul./ago. 2003.

MATIOSKI, A. R. et al. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plastic and Aesthetic Research*, Curitiba, v. 2, n. 6, p. 326-331, set./2015.

MCKEE, T. J. et al. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, Montreal, v. 9, n. 10542, p. 1-15, 2019.

MEDEIROS, Aldo Cunha; FILHO, Antônio Medeiros Dantas. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical and Clinical Research**, Natal, v. 7, n. 2, p. 87-102, out./dez. 2016.

MENEZES, T. N. D. et al. Percepção da imagem corporal e fatores associados em idosos residentes em município do nordeste brasileiro: um estudo populacional. **Ciência e Saúde Coletiva**, Campina Grande, v. 19, n. 8, p. 3451-3460, ago./nov. 2013.

MOHAMMED, F.A. Topical Permeation Characteristics of Diclofenac Sodium from NaCMC Gels in Comparison with Conventional Gel Formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Assiut, v. 27, n. 10, p. 1083–1097, 2001.

MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. **Conceitos e métodos para formação de técnicos em laboratórios de saúde: Conceitos e métodos para formação de profissionais de saúde**. 2 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010. 254 p.

MONTGOMERY, R., CONWAY, T. W., Spector, A. A **Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos**. 5 ed. São Paulo: Artes médicas, 1994, 482p.

MORAES, J. T. et al. CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DE LESÃO POR PRESSÃO: ATUALIZAÇÃO DO NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**, Mossoró, v. 6, n. 4, p. 267-271, ago/2016.

MURALIDHARAN, N. et al. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. **Journal of Food Science and Technology**, Tuticorin, v. 50, n. 6, p. 1106-1113, jun./ago. 2011.

NALINANON, Sitthipong; BENJAKUL, Soottawat; KISHIMURA, Hideki. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. **Journal of**

the Science of Food and Agriculture, Bangkok, v. 2010, n. 90, p. 1492-1500, jan./abr. 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. D. M.; DIAS, R. V. D. C. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: FASES E FATORES DE INFLUÊNCIA. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 4, p. 267-271, abril/2012.

OLIVEIRA, I.M.; ROSA, R.M. Introdução da regulação do pH no fluido extracelular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 14 de abril de 2021. Disponível em: <https://professor.ufrgs.br/sites/default/files/lucasalvares/files/poligrafo_3_-_tampoes_biologicos_.pdf>. Acesso em 14 de abril de 2021.

OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo De M.; DIAS, Regina Valéria Da Cunha. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 4, p. 267-271, abr./jan. 2012.

ORTOLAN, M. C. A. B. et al. Influence of aging on the skin quality of white-skinned women: the role of collagen, elastic material density, and vascularization. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, Ponta Grossa, v. 28, n. 1, p. 41-48, jan./fev. 2013.

PEDROSO, M.G.V. Estudo comparativo e colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA. **Dissertação (Mestrado em Química Analítica)** - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Paulo, 71p. 2009.

PULLAR J.M., CARR A.C., VISSERS M.C.M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. **Nutrients**, Christchurch, v. 9, n. 8, p. 1-27, aug./2017.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. Prostaglandins, and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, Philadelphia, v. 31, n.5, p. 986-1000, 2011.

RIVITTI, Evandro Ararigboia. **Manual de dermatologia clínica de sampaio e rivitti**. 1 ed. São Paulo: Artmed, 2014. 1-15 p.

RODRIGUES, M. *et al.* Wound Healing: A cellular perspective. **Physiol Rev**, Stanford, v. 99, n. 2019, p. 665-706, 2019.

RODRÍGUEZ Á.H. *et al.* Male-to-Female Gender-Affirming Surgery Using Nile Tilapia Fish Skin as a Biocompatible Graft. **J Minim Invasive Gynecol**, Cali, v. 27, n. 7, p. 1474-1475, nov./2020.

RONZON, JEAN-CLAUDE. Characterization of Acid-Soluble Type I Collagen in Solution by Viscosity Measurements. I. Some evidence about adsorption on the glass material and about electrostatic and ionic bindings in the molecular self-assembly process. **Collagen Rel. Res.**, Villeurbanne, v. 7, n. 1, p. 201-214, 1987.

ROWAN, M. P. *et al.* Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Critical Care**, Houston, v. 19, n. 1, p. 1-12, jan./2015.

SASMAL, Pranabesh; BEGAM, Howa. Extraction of Type-I collagen from sea fish and synthesis Hap/collagen composite. **Procedia Materials Science**, Kolkata, v. 5, n. 2014, p. 1136-1140, jul. 2014.

SCHMIDT, M. M. *et al.* Collagen extraction process. **International Food Research Journal**, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 913-922, mar./nov. 2015.

SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. **Annual Review of Biochemistry**, Madison, v. 2009, n. 78, p. 1-48, mar. 2010.

SHWAYDER T, AKLAND T. Neonatal skin barrier: structure, function, and disorders. **Dermatol Ther.**, Detroit, v.18, n.2, p. 87-103, Mar/Apr 2005.

SILVA, R. D. S. G. D. *et al.* Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. **Ciência Rural**, Rio Grande, v. 41, n. 5, p. 904-909, jul./mar. 2011.

SILVA, T. F. D; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São José do Rio Preto, v. 71, n. 3, p. 530-539, jun./2012.

SMANIOTTO, P. H. D. S. *et al.* Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-626, dez./jan. 2012.

SOUTOR, Carol; HORDINSKY, Maria. **Clinical Dermatology** 1 ed. New York: The McGraw-Hill Global Education Holdings, 2015. 1-5 p.

SUNG, J. H. *et al.* Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, Melbourne, v. 392, n. 2010, p. 232-240, fev/2010.

TANG, Jia; SAITO, Takashi. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. **BioMed Research International**, Hokkaido, v. 2015, n. 139476, p. 1-8, set. 2015.

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

TRUJILLO, A. N. *et al.* Demonstration of the Rat Ischemic Skin Wound Model. **Journal of Visualized Experiments**, Tampa, v. 2015, n. 98, p. 1-7, jan./2015.

TYLINGO, R. *et al.* Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagen from the Skin of African Catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic Cod (*Gadus morhua*). **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, Gdansk, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun./2016.

USUI, M. L. *et al.* Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Seattle, v. 56, n. 7, p. 687–696, 2008.

VARGAS, D.M., AUDÍ, L., CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev Ass Med Brasil**, Barcelona, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

VENKATESAN, J. *et al.* Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review. **Marine Drugs**, Incheon, v. 15, n. 143, p. 1-18, fev./mai. 2017.

VICENTE, I. S. T; ELIAS, Fabiana; FONSECA-ALVES, Carlos E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, Botucatu, v. 2010, n. 90, p. 392-398, set./2014.

WASIAK, J. *et al.* Dressings for superficial and partial thickness burns (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Melbourne, v. 2013, n. 3, p. 1-67, 2013. ALVES, A. P. N. N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e

análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Fortaleza, v. 14, n. 3, p. 203-210, mar/2015.

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

WILSON, K; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**: -. 7 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 399-405p

YAMADA, S. et al. Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. **Dental Materials Journal**, Nagasaki, v. 32, n. 1, p. 88-95, set. 2013.

YANG, L., DU, K. A comprehensive review on the natural, forced, and mixed convection of non-Newtonian fluids (nanofluids) inside different cavities. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Nanjing, v. 140, n. 1, p. 2033-2054, 2019.

YU, T. et al. Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance. **Expert Opin Drug Deliv**, Belfast, v.8, n. 10, p.1309-1322, 2011.

ZENG, S. et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, Guangdong, v. 116, n. 2009, p. 879-883, mar. 2009.

ROBINSON, M. *et al.* Natural moisturizing factors (NMF) in the stratum corneum (SC). I. Effects of lipid extraction and soaking. **Journal of Cosmetic Science**, Cincinnati, v. 6, n. 1, p. 13-22, 2010.

WANG K et al. Role of Vitamin C in Skin Diseases. **Front Physiol**. Kunming, v.4, n.9, p. 1-9 jul/2018.

YOUSEF, H, ALHAJJ, M. SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), **Epidermis**, New York, 22 de dezembro de 2017. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/nbk/nbk470464>>. Acesso em 28 de abril de 2021.