



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE**  
**RECURSOS NATURAIS**

**FRANCISCO FÁBIO PEREIRA DE SOUZA**

**DESENVOLVIMENTO DE EMULGÉIS À BASE DE COLÁGENO E GELATINA DE**  
***Oreochromis niloticus* ASSOCIADOS A EXTRATO DE *Chlorella vulgaris* E NITRATO DE**  
**PRATA PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS EM MODELO MURINO**

**FORTALEZA**

**2022**

FRANCISCO FÁBIO PEREIRA DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE EMULGÉIS À BASE DE COLÁGENO E GELATINA DE  
*Oreochromis niloticus* ASSOCIADOS A EXTRATO DE *Chlorella vulgaris* E NITRATO DE  
PRATA PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS EM MODELO MURINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Aplicação biotecnológica de moléculas biologicamente ativas.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

- S238d Souza, Francisco Fábio Pereira de.  
Desenvolvimento de emulgéis à base de colágeno e gelatina de *Oreochromis niloticus* associados a extrato de *Chlorella vulgaris* e nitrato de prata para o tratamento de queimaduras em modelo murino / Francisco Fábio Pereira de Souza. – 2022.  
89 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva.
1. Teste de biomateriais. 2. Reparo tecidual. 3. Cicatrização cutânea. 4. *Chlorella vulgaris*. I. Título.  
CDD 660.6
-

FRANCISCO FÁBIO PEREIRA DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE EMULGÉIS À BASE DE COLÁGENO E GELATINA DE  
*Oreochromis niloticus* ASSOCIADOS A EXTRATO DE *Chlorella vulgaris* E NITRATO DE  
PRATA PARA O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS EM MODELO MURINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Aplicação biotecnológica de moléculas biologicamente ativas.

Aprovado em: 15 / 07 / 2022

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva (coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos  
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

---

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Men de Sá Moreira de Souza Filho  
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Dedico aos meus pais, Expedita e Felizardo.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES); Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (SAP-MAPA); a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nos projetos “BRS Aqua - Ações estruturantes e de inovação para fortalecer as cadeias produtivas da aquicultura no Brasil” e “SEG - Embrapa: PC Tecnologia do pescado (código 21.17.02.001.06.00); ao projeto “Detecção, isolamento e caracterização de moléculas bioativas de plantas e microalgas com potenciais aplicações biotecnológicas” do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará; a Fundação de Apoio Científico e Tecnológico (FUNCAP), Brasil, [número de concessão FUNCAP-BP3-0139-00270.01.00/18 e CAPES-FUNCAP-AUXPE-88881.166822/2018-01].

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva, pelo acolhimento e por todo apoio e partilha de conhecimentos ao longo desse período, sendo ainda um profissional exemplar e pessoa muito agradável e humilde.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva pelo apoio de sempre, ensinamentos, conselhos e pelo exemplo de dedicação, compromisso e ética que o fazem um profissional excelente e uma pessoa admirável.

Ao meu supervisor de estágio na EMPRAPA-CNPAT Prof. Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho pelos ensinamentos, uma pessoa com um alto astral contagiante, de um coração gigante e muito querido por todos à sua volta.

À banca examinadora formada pelos professores doutores Mayron Alves de Vasconcelos, Bartolomeu Warlene Silva de Souza e Men de Sá Moreira de Souza Filho pela colaboração e orientações para melhoria da versão final deste manuscrito.

Às equipes dos laboratórios/grupos de pesquisa: Grupo de Biotecnologia e Molecular e Estrutural - GBME, em nome dos coordenadores professor André Coelho e Bruno Rocha, e dos

demais integrantes, especialmente a Talita Abrante, Samara Sena, Vanessa Feitosa, Wallady Barroso, Jéssica e Bruna Nepomuceno; Laboratório de Tecnologia da Biomassa - LTB da EMBRAPA, em nome do pesquisador Prof. Dr. Men de Sá e do chefe de laboratório e pesquisador Dr. Adriano Mattos, e aos demais integrantes do LTB, especialmente a Lorena Leite, Vanessa Pereira e Rayanne Claudino; Laboratório Integrado de Biomoléculas, em nome do coordenador Prof. Dr. Edson Holanda, da Profa. Dra. Fábria Karine e dos doutorandos Aryane e Alexandre Lopes; Ao Laboratório de Biomateriais da UFC-Sobral e ao Grupo de Estudos em Morfologia - GEM, em nome do coordenador Prof. Dr. Igor Iuco, à mestranda Lana Araújo e aos estudantes Mirrael Sousa, Carolina Oliveira, Adresa Santiago, Abrahao Lincoln e Yasmin Menezes.

Ao prof. Dr. Antonio Gomes de Souza Filho pela importante contribuição como pró-reitor de Pesquisa e Pós-graduação da UFC durante o período de 2016 a 2019, sendo especialmente importante no apoio ao meu Programa de Pós-graduação no processo de implementação da minha bolsa de estudos que foi essencial para minha manutenção e estadia em Fortaleza e conclusão do curso.

À minha noiva Nazaré Alves por todo apoio e companheirismo ao longo dessa trajetória.

À minha família por todo o apoio, especialmente à minha mãe Maria Expedita, agricultora, exemplo de força, humildade, generosidade e fé, que mesmo com todas as dificuldades não mediu esforços para nos proporcionar uma vida digna e honesta; ao meu pai Felizardo Pereira, agricultor e pedreiro, exemplo de integridade, garra, humildade e sabedoria, que, assim como minha mãe, sempre fez e faz o melhor pelos seus filhos, netos e sobrinhos; e à minha vó materna Dona Cesarina, que tem me ensinado a importância da paciência, da empatia, do saber ouvir e da gratidão.

## RESUMO

Os tratamentos farmacológicos disponíveis para queimaduras possuem ação limitada ao controle da proliferação microbiana e esta lacuna motiva a pesquisa para desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e capazes de estimular diretamente o processo de cicatrização cutânea. O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar emulgéis à base de colágeno e gelatina da pele de tilápia do Nilo associados ou não ao extrato de *Chlorella vulgaris* e nitrato de prata para o tratamento de queimaduras. Colágeno e gelatina extraídos da pele de tilápia, e extrato bruto total (Ebt) de *C. vulgaris* foram caracterizados físico-quimicamente e utilizados na formulação dos emulgéis. Foram desenvolvidas 3 formulações de emulgéis: colágeno (COL) + gelatina (GEL) (E1), COL + GEL + Ebt 1% (E2) e COL + GEL + Ebt 1% + nitrato de prata 0,1% (E3). Como controles foram utilizados sulfadiazina de prata e coágulo sanguíneo. Os emulgéis foram caracterizados por FTIR, reologia e eletroforese, citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagens de queratinócitos e fibroblastos, e potencial cicatrizante *in vivo* em modelo de queimadura. Para o ensaio *in vivo*, ratos Wistar albinos machos receberam anestesia geral, tiveram a região dorsal tricotomizada e foram induzidas 5 queimaduras por animal, uma para cada tratamento. As queimaduras foram tratadas com as formulações e a reaplicação dos tratamentos foi feita a cada 2 dias. Foi feito registro fotográfico individual das lesões nos tempos experimentais de 0, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Após eutanásia realizou-se a necropsia excisional, fixação e processamento histológico. Foi realizada a descrição e a quantificação de critérios inflamatórios e de reparo em análise cega. COL e GEL apresentaram boas características físico-químicas. O Ebt apresentou bom perfil proteico, atividade antioxidante e citotoxicidade *in vitro* moderada. E1, E2 e E3 apresentaram características físico-químicas e reológicas similares e perfil de citotoxicidade variado. No estudo *in vivo* não houve diferença significativa no percentual de fechamento da lesão entre os grupos e controles. Entretanto, a análise microscópica demonstrou maiores escores de polimorfonucleares em E1 e de neovascularização e re-epitelização em E3. O emulgel de COL+GEL+Ebt+AgNO<sub>3</sub> apresenta potencial como formulação aplicada à cicatrização de queimaduras térmicas, sendo necessários estudos clínicos futuros.

**Palavras-chaves:** teste de biomateriais; reparo tecidual; cicatrização cutânea; *Chlorella vulgaris*.



## ABSTRACT

The pharmacological treatments available for burns have limited action to control microbial proliferation and this gap motivates research to develop more effective therapeutic agents capable of directly stimulating the skin healing process. The aim of this study was to develop and characterize emulsions based on collagen and gelatin from Nile tilapia skin associated or not with *Chlorella vulgaris* extract and silver nitrate for the treatment of burns. Collagen and gelatin extracted from tilapia skin, and total crude extract (Ebt) of *C. vulgaris* were physicochemically characterized and used in the formulation of emulgels. Three formulations of emulgels were developed: collagen (COL) + gelatin (GEL) (E1), COL + GEL + Ebt 1% (E2) and COL + GEL + Ebt 1% + silver nitrate 0.1% (E3). As controls, silver sulfadiazine and blood clot were used. The emulgels were characterized by FTIR, rheology and electrophoresis, *in vitro* cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast lines, and *in vivo* healing potential in a burn model. For the *in vivo* assay, male albino Wistar rats received general anesthesia, had the dorsal region shaved and 5 burns were induced per animal, one for each treatment. The burns were treated with the formulations and the reapplication of the treatments was done every 2 days. Individual photographic records were made of the lesions at the experimental times of 0, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. After euthanasia, excisional necropsy, fixation and histological processing were performed. The description and quantification of inflammatory and repair criteria were performed in a blinded analysis. COL and GEL showed good physicochemical characteristics. Ebt showed a good protein profile, antioxidant activity and moderate *in vitro* cytotoxicity. E1, E2 and E3 presented similar physicochemical and rheological characteristics and varied cytotoxicity profile. In the *in vivo* study, there was no significant difference in the percentage of lesion closure between groups and controls. However, microscopic analysis showed higher scores for polymorphonuclear cells in E1 and for neovascularization and re-epithelialization in E3. The COL+GEL+Ebt+AgNO<sub>3</sub> emulgel has potential as a formulation applied to the healing of thermal burns, requiring further clinical studies.

**Keywords:** biomaterials testing; tissue repair; cutaneous healing; *Chlorella vulgaris*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Ilustração do aspecto visual e das estruturas teciduais atingidas por queimaduras de diferentes graprofundidade.....	15
Figura 2	– Diagramas de Lund e Browder para determinar a severidade de queimaduras considerando a área de superfície corporal total atingida.....	17
Figura 3	– Ilustração das características celulares e moleculares e fases do processo de cicatrização sequencial de lesão cutânea.....	19
Figura 4	– Ilustração mostrando as zonas de dano tecidual ocasionadas por queimadura de espessura parcial e sua distribuição ao longo das camadas da pele e do tecido subcutâneo.....	24
Figura 5	– Eventos inflamatório e de reparo do processo de cicatrização mediado por biomaterial em função do tempo.....	27
Figura 6	– Ilustração da aplicação tópica de emulgel e sua atuação como sistema de liberação controlada de bioativo através da pele.....	32
Figura 7	– Eletroforese SDS-PAGE em condição redutora do Ebt de <i>C. vulgaris</i> .....	51
Figura 8	– Fotobiorreator utilizado para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> (A) e biomassa microalgal liofilizada (B) e umedecida (C).....	52
Figura 9	– Atividade antimicrobiana do Ebt de <i>C. vulgaris</i> contra cepas ATTC de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva pelo método de diluição em caldo.....	54
Figura 10	– Citotoxicidade do Ebt de <i>C. vulgaris</i> pelo método de Alamar Blue utilizando queratinócitos e fibroblastos.....	55
Figura 11	– Análise térmica por TGA do colágeno (A) e gelatina (B) da pele <i>O. niloticus</i> .....	56
Figura 12	– Análise térmica por DSC do colágeno e da gelatina de <i>O. niloticus</i> .....	57
Figura 13	– Espectros vibracionais por FTIR dos emuleis e do colágeno e da gelatina separadamente de <i>O. niloticus</i> .....	58

Figura 14 – Eletroforese SDS-PAGE em condição redutora do colágeno e da gelatina isolados (A), dos emulgéis (B).....	59
Figura 15 – Aspecto visual dos emulgéis E1 (A), E2 (E) e E3 (I) e testes de alça tixotrópica (B, F e J), tempo dependência (C, G e K) e temperatura (D, H e L).....	61
Figura 16 – Morfologia celular e citotoxicidade por ensaios de XTT e NR de linhagens de queratinócitos HACAT (A, B e C) e fibroblastos L929 (D, E e F) expostas a diferentes emulgéis.....	64
Figura 17 – Análise qualitativa (A) e quantitativa (B) do percentual de contração das lesões cutâneas entre diferentes grupos e tempos experimentais in vivo.....	66
Figura 18 – Análise microscópica descritiva da área de queimaduras de espessura parcial em ratos tratadas com emulgéis e controles ao longo dos tempos experimentais (A) e critérios histopatológicos após lesão adotados para análise (B): (1) polimorfonucleares; (2) mononucleares; (3) crosta; (4) vasos sanguíneos; (5) fibroblastos; (6) re-epitelização.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparativo do perfil de aminoácidos entre diferentes espécies microalgais e outras fontes de proteínas convencionais como o ovo e a soja. Padrão de referência (g por 100 proteínas).....	34
Tabela 2 – Composição de aminoácidos do extrato bruto total de <i>Chlorella vulgaris</i> ...	53
Tabela 3 – Parâmetros reológicos do modelo de Ostwald de Waele ajustado às diferentes formulações.....	60
Tabela 4 – Análise histomorfométrica dos critérios microscópicos da lesão cutânea tratada com os diferentes grupos experimentais in vivo. (Continua).....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrômetro
ABA	American Burn Association
ASCT	Área de Superfície Corporal Total
CGF	Fator de crescimento de Chlorella
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
Ebt	Extrato bruto total
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FTIR	Espectroscopia no infra vermelho por transformada de Fourier
g	Gramas
IL	Interleucina
KDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
m/v	Massa/volume
MCP	Proteína quimio-atraente de macrófago
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
PDFG	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	potencial hidrogeniônico
TGA	Análise termogravimétrica
TGF	Fator de crescimento de tecido
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- ® Marca Registrada
- °C Graus celsius
- $\alpha$  Alfa - primeira letra do alfabeto grego
- $\beta$  Beta - segunda letra do alfabeto grego
- $\gamma$  Gama - terceira letra do alfabeto grego
- $\eta$  Eta - sétima letra do alfabeto grego
- $\lambda$  Lambda - décima primeira letra do alfabeto grego

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Queimaduras térmicas: aspectos gerais</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Aspectos fisiopatológicos do processo de cicatrização de lesões cutâneas</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.1</b>	<i>Organização estrutural da pele de mamíferos</i> .....	<b>17</b>
<b>2.2.2</b>	<i>Lesão cutânea e homeostase tecidual</i> .....	<b>18</b>
<b>2.2.3</b>	<i>Processo de cicatrização de lesões cutâneas</i> .....	<b>18</b>
<b>2.2.4</b>	<i>Fisiopatologia do processo de cicatrização cutânea</i> .....	<b>20</b>
<b>2.2.5</b>	<i>Fase proliferativa</i> .....	<b>21</b>
<b>2.2.6</b>	<i>Cicatrização de lesões cutâneas por queimadura</i> .....	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Biomateriais: aspectos gerais e aplicabilidade no reparo tecidual</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Uso de colágeno e gelatina como biomaterial</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.1</b>	<i>Colágeno da pele de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)</i> .....	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>Emulgel: aspectos gerais</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Microalgas como fonte de bioativos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.7</b>	<b>Uso de prata no tratamento de lesões cutâneas</b> .....	<b>35</b>
<b>2.8</b>	<b>Modelo de queimadura experimental em ratos</b> .....	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos e legais</b> .....	<b>38</b>

<b>4.2</b>	<b>Extração e caracterização físico-química de colágeno e de gelatina da pele de <i>O. niloticus</i></b> .....	<b>38</b>
4.2.1	<i>Extração do colágeno e da gelatina</i> .....	38
4.2.2	<i>Caracterização físico-química</i> .....	39
<b>4.3</b>	<b>Obtenção e caracterização do extrato bruto da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i></b> ...	<b>40</b>
4.3.1	<i>Obtenção do extrato bruto</i> .....	40
4.3.2	<i>Dosagem de proteínas solúveis pelo método de Bradford</i> .....	40
4.3.3	<i>Análise do conteúdo de aminoácidos</i> .....	41
4.3.4	<i>Atividade antioxidante pelo método do DPPH</i> .....	41
4.3.5	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	42
4.3.6	<i>Avaliação da atividade antibacteriana</i> .....	43
<b>4.4</b>	<b>Preparo e caracterização de emulgéis à base de colágeno e gelatina de <i>O. niloticus</i></b> .....	<b>44</b>
4.4.1	<i>Caracterização físico-química</i> .....	45
4.4.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	45
4.4.3	<i>Avaliação de cicatrização in vivo em modelo de queimadura</i> .....	47
4.4.3.1	<i>Animais</i> .....	47
4.4.3.2	<i>Indução das queimaduras</i> .....	47
4.4.3.3	<i>Grupos experimentais/tratamentos</i> .....	48
4.4.3.4	<i>Análise macroscópica</i> .....	49
4.4.3.5	<i>Análise microscópica</i> .....	49
<b>4.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção e caracterização do extrato bruto da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i></b> ...	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização físico-química do colágeno e da gelatina isolados e dos emulgéis</b> 55	<b>55</b>



5.2.1	<i>Análises por TGA, DSC, FTIR e eletroforese</i> .....	55
5.2.2	<i>Análise reológica dos emulgéis</i> .....	59
5.3	<b>Citotoxicidade <i>in vitro</i> e potencial cicatrizante <i>in vivo</i></b> .....	62
5.3.1	<i>Ensaio de citotoxicidade com XTT e NR</i> .....	62
5.3.2	<i>Potencial cicatrizante em modelo de queimadura</i> .....	65
5.3.2.1	<i>Análise macroscópica das lesões</i> .....	65
5.3.2.2	<i>Análise microscópica descritiva dos critérios inflamatórios e de reparo</i> .....	67
5.3.2.3	<i>Análise microscópica semiquantitativa dos critérios histopatológicos</i> .....	69
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	73
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA CEUA-UFC</b> .....	84
	<b>ANEXO B – APARATO UTILIZADO PARA INDUÇÃO DAS QUEIMADURAS</b> .....	85
	<b>ANEXO C – PROCEDIMENTO DE INDUÇÃO DAS QUEIMADURAS EM</b> <b>RATOS</b> .....	86