

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANA CAROLINA TERSO VENTURA

**PEPTÍDEOS HIDROLISADOS DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)
COMO AGENTE CICATRIZANTE PARA APLICAÇÃO VETERINÁRIA.**

PONTA GROSSA

2026

ANA CAROLINA TERSO VENTURA

**PEPTÍDEOS HIDROLISADOS DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)
COMO AGENTE CICATRIZANTE PARA APLICAÇÃO VETERINÁRIA.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.

Coorientadora: Prof. Dr. Priscileila Colerato Ferrari.

PONTA GROSSA

2026

V468 Ventura, Ana Carolina Terso
Peptídeos hidrolisados de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como agente cicatrizante para aplicação veterinária / Ana Carolina Terso Ventura. Ponta Grossa, 2026.
94 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.
Coorientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari.

1. Peptídeos hidrolisados. 2. Cicatrização de feridas. 3. Pele de tilápia - Uso terapêutico. 4. Animais de companhia. 5. Hidrogéis - Uso farmacêutico. I. Beltrame, Flávio Luís. II. Ferrari, Priscileila Colerato. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.19

ANA CAROLINA TERSO VENTURA

**PEPTÍDEOS HIDROLISADOS DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)
COMO AGENTE CICATRIZANTE PARA APLICAÇÃO VETERINÁRIA.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Mestrado e Doutorado, Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 13 de março de 2026.



Documento assinado digitalmente
FLAVIO LUIS BELTRAME
Data: 08/09/2026 15:38:08-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame – UEPG – Presidente



Documento assinado digitalmente
EVELIN LEMOS DE OLIVEIRA
Data: 09/09/2026 15:27:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Evelin Lemos de Oliveira – UEM – Membro titular externo



Documento assinado digitalmente
PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN
Data: 09/09/2026 15:51:22-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin – UEPG – Membro titular interno

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA – UEPG
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF
Bloco M Sala 93B – Campus Universitário em Uvaranas – Fone (42) 2102-8937
Av. Carlos Cavalcanti, 4748; CEP: 84030-900 – PONTA GROSSA – PR - BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder o privilégio de completar essa etapa da minha vida;

Agradeço à minha família pelo apoio e suporte. Obrigada mamãe e papai por sempre confiarem em mim e nunca me deixarem desistir de correr atrás dos meus sonhos. Obrigada Fer, minha *little sis*, por sempre me motivar e incentivar. Meu muito obrigada ao meu namorado Matheus por me aguentar falando de peptídeo de tilápia durante todo este tempo. Agradeço do fundo do coração à minha família da fé, a todos os irmãos que ganhei na igreja e na CRU Campus e que me apoiam nesse caminho, me aconselhando e orando por mim. Vocês moram no meu coração.

Agradeço ao meu orientador prof. Flávio por todos os aprendizados e por acompanhar o meu desenvolvimento como cientista desde minha época como aluna de IC. Agradeço à minha co-orientadora profa. Priscileila pela ajuda e sugestões construtivas para este trabalho. Minha sincera gratidão à professora Jesiane e a todos do laboratório de Biodiversidade pela ajuda nos ensaios microbiológicos. Meu muito obrigada à banca da qualificação, professoras Jesiane e Patrícia Mazureki, pelas sugestões e colocações que certamente agregaram a esse trabalho, bem como às professoras da banca de defesa, professoras Patrícia Döll e Evelin. Minha gratidão à professora Adriana pela ajuda com os dados do estudo clínico e ao professor Airton pelo auxílio com as análises estatísticas.

Agradeço aos meus colegas de laboratório e a todos os integrantes do grupo de pesquisa *Pharmacia Chimica*. Obrigada Anna e Thais pelas conversas e suporte neste tempo. Agradeço à Luize pelo apoio e ajuda nos experimentos deste trabalho; à Fabiana e ao veterinário Rodrigo que me ajudaram na avaliação clínica dos animais; à Aline que colaborou com os testes da primeira formulação do hidrogel, muito obrigada.

Minha profunda gratidão às minhas amigas e colegas de PPGCF Gabi e Mari pelos momentos que passamos juntas, pelos cafés e estudos e por todas as risadas. Vocês são luz na minha vida.

*“Havia uma Palavra, uma voz. Havia um artista, mas não havia arte ainda.
E aquela Voz disse “Luz”, e ela própria estendeu uma tela finita para pintar a única
coisa digna de ser pintada, para pintar o Eu Sou.”*

-Notas da xícara maluca (Wilson, N. D.)

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo de mamíferos e danos a ela podem causar feridas complexas e levar a prejuízos, contaminação bacteriana e perda da função. É necessário que exista opções de tratamento para feridas de pele que cicatrizem no menor tempo e que seja de baixo custo ao paciente. A pele da tilápia é amplamente estudada por conta de suas atividades cicatrizantes, e peptídeos hidrolisados extraídos da pele de tilápia (PHT) também demonstraram este efeito. Este trabalho se propôs em um primeiro momento a complexar peptídeos hidrolisados de tilápia com zinco para avaliar a sua atividade antimicrobiana. Este complexo foi caracterizado por técnicas de FTIR e DRX e avaliado contra bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* empregando-se as técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bacteriostática Mínima (CBM). Este complexo peptídeo-zinco apresentou melhora na atividade antimicrobiana apenas contra *S. aureus* ao se comparar com resultados obtidos apenas para o peptídeo isolado, tendo sido obtida uma CIM de 1,87 mg/mL. No teste de CBM, o complexo PHT-Zn se mostrou apenas bacteriostático. Devido ao rendimento do complexo abaixo do esperado, de 37,67%, esta frente de pesquisa foi abandonada e em um segundo momento, buscou-se desenvolver e estudar hidrogéis para veicular os PHT, avaliar a sua estabilidade e a atividade cicatricial em feridas de cães e gatos. Para isto, foram propostas três formulações de hidrogéis contendo PHT, as quais foram denominadas F1, F2 e F3. Todas elas foram submetidas a um estudo de estabilidade acelerada em condições de temperatura e umidade controladas a 40 °C e 75% de umidade relativa durante 90 dias para as formulações F1 e F2 e 180 dias para a formulação F3. Neste estudo de estabilidade, foram avaliadas as características organolépticas, pH, viscosidade, espalhabilidade e densidade. No estudo de estabilidade, as formulações F1 e F2 apresentaram alterações de viscosidade e espalhabilidade, além de alterações de coloração; já F3 não apresentou alterações organolépticas e nos demais parâmetros avaliados, tanto para as amostras armazenadas em estufa quanto para amostras armazenadas em temperatura ambiente durante 180 dias. A avaliação clínica de feridas de primeira intenção tratadas com o hidrogel HEC-PHT (F3) apresentou redução de presença de infecções. Houve redução da área de feridas por segunda intenção tratadas com HEC-PHT a partir da primeira semana de tratamento. Esses dados mostram que o hidrogel HEC-PHT pode

se tornar uma opção para o tratamento de feridas complexas em clínicas veterinárias e fortalece o banco de dados sobre as propriedades biológicas de peptídeos extraídos de pele de tilápia.

A autora declara que ferramentas de Inteligência Artificial foram utilizadas neste trabalho para auxiliar na busca por referências na literatura. Ferramenta utilizada: *Consensus Ai for Research*. O conteúdo final foi criticamente revisado pela autora que assume total responsabilidade pela veracidade do texto de acordo com a Portaria CNPq nº 2.664/2026.

Palavras-chave: peptídeos hidrolisados; cicatrização de feridas; pele de tilápia; animais de companhia; hidrogéis.

ABSTRACT

The skin is the largest organ in the body of mammals, and damage to it can cause complex wounds, leading to economic losses, bacterial contamination, and loss of function. It is necessary to develop treatment options for skin wounds that promote healing in the shortest possible time and at a low cost to the patient. Tilapia skin has been widely studied due to its healing properties, and hydrolyzed peptides extracted from tilapia skin (THP) have also demonstrated this effect. Initially, this work aimed to complex hydrolyzed tilapia peptides with zinc in order to evaluate their antimicrobial activity. This complex was characterized using FTIR and XRD techniques and was evaluated against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Pseudomonas aeruginosa* by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The peptide–zinc complex showed improved antimicrobial activity only against *S. aureus*, presenting a MIC of 1.87 mg/mL when compared with the results obtained for the isolated peptide. In the MBC test, the THP–Zn complex showed only bacteriostatic activity. Due to the low yield of the peptide–complex, of 37,67%, this research stage was interrupted. In a second stage, this research aimed to develop and study hydrogels to deliver hydrolyzed tilapia peptides, as well as to evaluate their stability and wound-healing activity in dogs and cats. For this purpose, three hydrogel formulations containing THP were proposed, which were named F1, F2, and F3. All formulations were subjected to an accelerated stability study under controlled temperature and humidity conditions at 40 °C and 75% relative humidity for 90 days for formulations F1 and F2 and 180 days for formulation F3. In this stability study, organoleptic characteristics, pH, viscosity, spreadability, and density were evaluated. During the stability study, formulations F1 and F2 showed changes in viscosity and spreadability, as well as color alterations. In contrast, F3 showed no organoleptic changes or alterations in the other evaluated parameters, both for samples stored in an incubator and for those stored at room temperature for 180 days. The clinical evaluation of first-intention wounds treated with HEC-THP hydrogel showed a reduction in the presence of infections. There was also a reduction in the area of second-intention wounds treated with HEC-THP starting from the first week of treatment. These data indicate that the HEC-THP hydrogel may become a potential option for the treatment of complex wounds in veterinary clinics and strengthen the database on the biological properties of peptides extracted from tilapia skin.

The author declares that Artificial Intelligence tools were used in this work to assist in the search for references in the literature. Tool used: Consensus AI for Research. The final content was critically reviewed by the author, who assumes full responsibility for the veracity of the text in accordance with CNPq Ordinance No. 2,664/2026.

Keywords: Hydrolyzed peptides; wound healing; tilapia skin; companion animals; hydrogels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras de hidrolisado de tilápia na forma de líquido.....	20
Figura 2 - Amostras de hidrolisado de tilápia sendo secas no liofilizador.	20
Figura 3 - Complexo PHT-Zn após centrifugação e após liofilização.....	24
Figura 4 - Espectro de FTIR do complexo PHT-Zn e do PHT.....	25
Figura 5 - DRX do complexo PHT-Zn e do PHT.	27
Figura 6 - Placas após 24h em estufa a 37 °C.	28
Figura 7 - Gráficos de inibição dos microrganismos.....	29
Figura 8 - Crescimento dos microrganismos após plaqueamento das amostras com zinco isolado.....	30
Figura 9 - Estrutura da pele.	34
Figura 10 – Fases do reparo de feridas.....	35
Figura 11 - Estrutura do colágeno.....	41
Figura 12 – Atuação do colágeno durante as fases de reparo de feridas.	42
Figura 13 - Estrutura química do polímero hidroxietilcelulose.....	46
Figura 14 – Estrutura química do sorbato de potássio.....	49
Figura 15 – Estrutura química da imidazolidinilureia.....	50
Figura 16 – Matérias-primas usadas na fabricação do hidrogel.....	54
Figura 17 - Hidrogéis F1 no A) tempo 0 e B) no tempo 90.....	60
Figura 18 - Características dos hidrogéis F2 nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias.	61
Figura 19 - pH dos hidrogéis F1.....	62
Figura 20 - pH dos hidrogéis F2.....	63
Figura 21 - Viscosidade por reômetro dos hidrogéis F1.....	64
Figura 22 - Viscosidade dos hidrogéis F2.....	64
Figura 23 - Espalhabilidade dos hidrogéis F1.....	65
Figura 24 – Espalhabilidade dos hidrogéis F2.....	66
Figura 25 - Densidade dos hidrogéis F1.....	67
Figura 26 - Densidade dos hidrogéis F2.....	67
Figura 27 - Avaliação da viscosidade em 30 rpm de formulações de hidrogel com diferentes concentrações de hidroxietilcelulose.	68
Figura 28 - Características organolépticas dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura de estufa em temperatura ambiente.....	70

Figura 29 - Viscosidade dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura de estufa.	70
Figura 30 - Viscosidade dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura ambiente.	71
Figura 31 - Avaliação do pH dos hidrogéis F3.	72
Figura 32 - Espalhabilidade dos hidrogéis F3 armazenados em estufa.	72
Figura 33 – Espalhabilidade dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura ambiente.	73
Figura 34 - Densidade aparente dos hidrogéis F3.	73
Figura 35 - Avaliação da retração da ferida dos animais 1-5 (Grupo Tratamento) dos dias 0 ao 35.	76
Figura 36 - Avaliação da retração da ferida dos animais 7-10 do Grupo Controle dos dias 7 a 28.	77
Figura 37 - Retração da ferida para os Grupos Tratamento e Controle nos dias 7 e 14 incluindo todos os animais.	81
Figura 38 - Retração da ferida para os Grupos Tratamento e Controle nos dias 7 e 14 incluindo apenas os cães.	82
Figura 39 - Evolução da ferida do animal 6 (Grupo Tratamento).	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração de amostra, quantidade de amostra e de meio de cultura em cada poço.....	23
Tabela 2 – Alterações nas bandas de infravermelho identificadas no complexo PHT-Zn quando comparadas às bandas encontradas para a amostra PHT.	26
Tabela 3 - Peptídeos identificados no hidrolisado de tilápia usado neste estudo.	44
Tabela 4 - Propriedades químicas e físicas do polímero hidroxietilcelulose.	46
Tabela 5 – Matérias-primas e suas concentrações adicionadas às formulações F1, F2 e F3.	53
Tabela 6 – Características organolépticas do hidrogel F1.....	59
Tabela 7 - Características organolépticas do hidrogel F2.....	60
Tabela 8 - Características organolépticas dos hidrogéis F3 armazenados em estufa e em temperatura ambiente.	69
Tabela 9 - Aspecto da ferida no 7º dia.	74
Tabela 10 - Tecido de granulação no 7º dia.....	75
Tabela 11 - Cor da ferida no 7º dia.....	75
Tabela 12 - Sinais de infecção no 7º dia.....	75
Tabela 13 - Bordas da ferida no 7º dia.....	75
Tabela 14 - Características dos animais do Grupo Tratamento.	77
Tabela 15 - Características dos animais do Grupo Controle.	78
Tabela 16 - Características das feridas dos animais estudados do Grupo Tratamento.	78
Tabela 17 - Características das feridas dos animais estudados do Grupo Controle.....	79
Tabela 18 - Área e retração das feridas dos animais dos Grupos Tratamento e Controle.....	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1 – SÍNTESE DO COMPLEXO PEPTÍDEO-ZINCO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	17
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1.1 Peptídeos com atividade antimicrobiana.....	17
1.1.2 Complexos de peptídeos com metais.....	18
1.2.3 Zinco.....	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1. Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1.3.1 Obtenção do peptídeo hidrolisado de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	19
1.3.2 Obtenção do complexo peptídeo-zinco	20
1.3.3 Caracterização do complexo por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR)	21
1.3.4 Análise do complexo por Difração de Raios-X	22
1.3.5 Avaliação do potencial antimicrobiano do complexo PHT-Zn	22
1.3.5.1 Preparo dos inóculos.....	22
1.3.5.2 Preparo das diluições de PHT-Zn e ZnSO ₄	22
1.3.5.3 Análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	23
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
1.4.1 Obtenção do complexo peptídeo-zinco (PHT-Zn)	24
1.4.2 Caracterização do complexo	25
1.4.3 Avaliação do potencial antimicrobiano.....	27
CAPÍTULO 2– HIDROGÉIS CONTENDO PEPTÍDEO DE PELE DE TILÁPIA: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E ENSAIOS CLÍNICOS.....	32
2.2 REVISÃO DA LITERATURA.....	32
2.2.1 Pele e anexos cutâneos	32
2.2.2 Cura de feridas: etapas e mecanismos envolvidos.....	35
2.2.3 Colágeno.....	40
2.2.4 Pele de tilápia e suas aplicações na cicatrização	43

2.2.5 Géis	45
2.2.6 Estudo de estabilidade e desenvolvimento de formulação	47
2.2.7 Conservantes antimicrobianos em formulações tópicas	48
2.2.7.1 Sorbato de potássio.....	49
2.2.7.2 Imidazolidinilureia	50
2.2.7.3 Metabissulfito de sódio.....	50
2.2.7.4 Metilparabeno.....	50
2.1 OBJETIVOS.....	51
2.1.1 Objetivo geral	51
2.1.2 Objetivos específicos.....	51
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.3.1 Desenvolvimento da formulação de hidrogel contendo PHT	51
2.3.2 Avaliação da estabilidade acelerada.....	54
2.3.2.1 Avaliação das características organolépticas.....	55
2.3.2.2 Densidade aparente	55
2.3.2.3 Avaliação da viscosidade.....	56
2.3.2.4 Estudo da espalhabilidade.....	56
2.3.2.5 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	57
2.3.3 Estudo clínico	57
2.3.3.1 Avaliação da cicatrização em feridas por primeira intenção	57
2.3.3.2 Avaliação da cicatrização em feridas por segunda intenção	57
2.3.4 Análise estatística	58
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
2.4.1 Estudo de estabilidade acelerada de hidrogéis F1 e F2.....	58
2.4.1.1 Avaliação das características organolépticas.....	58
2.4.1.2 Avaliação do pH das formulações F1 e F2	61
2.4.1.3 Avaliação das características reológicas dos hidrogéis F1 e F2.....	63
2.4.1.4 Avaliação da espalhabilidade dos hidrogéis F1 e F2.....	65
2.4.1.5 Avaliação da densidade dos hidrogéis F1, F2 e F3.....	66
2.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada dos hidrogéis da formulação F3	67
2.4.3 Estudo clínico do hidrogel F3 em animais de companhia	74
2.4.3.1 Avaliação da cicatrização de feridas por primeira intenção	74
2.4.3.2 Avaliação da cicatrização de feridas por segunda intenção	76

CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO A – FICHA DE AVALIAÇÃO CICATRICIAL	94

INTRODUÇÃO

A pele é uma barreira fisiológica contra infecções e sua ruptura ou dano pode causar processos inflamatórios e infecciosos (Liu; Hsieh; Chen, 2022). O tratamento de feridas é um problema de saúde que se agrava com o envelhecimento e condições de saúde como diabetes e obesidade (Lin, Pei Hui *et al.*, 2018). O processo fisiológico da cicatrização e do reparo tecidual é complexo e inclui coagulação, processo inflamatório inicial seguido de reepitelização com formação de tecido de granulação, angiogênese e formação de cicatriz (Lin *et al.*, 2018). O reparo da pele envolve células, como queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos (Liu; Hsieh; Chen, 2022). Durante a reepitelização, há migração de queratinócitos para a ferida o que cria uma camada de proteção contra infecções. Ao mesmo tempo, os fibroblastos secretam fatores de crescimento e colágenos tipo I e III formando o tecido de granulação (Liu; Hsieh; Chen, 2022).

O colágeno é a proteína encontrada em maior abundância na pele e ossos de animais. Ele é encontrado na matriz extracelular do tecido conjuntivo e é importante para garantir resistência. Sua estrutura é formada por 3 cadeias polipeptídicas organizadas em tripla hélice. A sequência de aminoácidos do colágeno geralmente é uma repetição tripeptídica composta por glicina-X-Y, em que X e Y podem ser prolina e 4-hidroxiprolina, um aminoácido incomum (Kadira, 2024; Potaros; Raksakulthai; Runglerdkreangkrai, 2009; Yan *et al.*, 2020).

A maioria do colágeno obtido para uso nas indústrias cosméticas e farmacêuticas possui origem da pele de bovinos e suínos ou de subprodutos da indústria de frango. Essas fontes possuem algumas limitações devido às restrições por grupos religiosos e éticos que não consomem produtos oriundos desses animais. Ademais, há restrições de qualidade em vista das possíveis contaminações com doenças, como a encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca). Esses fatores geram a preocupação para a busca de outras fontes de extração de colágeno (Ge *et al.*, 2021; Kadira, 2024).

Vários produtos de pele de peixes estão sendo estudados devido ao colágeno extraído dessas fontes não ter relação com doenças zoonóticas, como a encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca). Além de possuir baixa imunogenicidade, podem ser fonte de lucro às indústrias de alimentos que geram resíduos de peixes.

Esses produtos apresentam uma fonte viável economicamente à fabricação de produtos para uso biomédico e farmacêutico (Kadira *et al.*, 2024).

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é uma opção para a obtenção de peptídeos de colágeno e um dos peixes de água doce mais cultivados (Kadira *et al.*, 2024). A pele de tilápia vem sendo estudada para ser usada como enxerto de pele para queimaduras há alguns anos como alternativa às rejeições e efeitos adversos de outros tipos de enxertos. Além do custo reduzido e das propriedades cicatrizantes já demonstrada por esse material, a pele de tilápia contém diversos peptídeos e é constituída de colágeno, majoritariamente do tipo I. Este material seco pode render até 40% de colágeno. Estudos já mostraram que ela reduz os riscos de infecção e é uma fonte de curativos oclusivos de origem biológica (Elbially *et al.*, 2020; Ghosh *et al.*, 2023; Kadira, 2024; Silva, Aline Maia *et al.*, 2022).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivos estudar os peptídeos hidrolisados a partir da pele da tilápia complexado com zinco, caracterizando o complexo e avaliando um possível incremento na atividade antimicrobiana deste material e na sequência propor a formulação de hidrogéis contendo os peptídeos hidrolisados extraídos da pele de tilápia; estes hidrogéis foram avaliados quanto a sua estabilidade e eficácia na cicatrização de feridas em cães e gatos.

CAPÍTULO 1 – SÍNTESE DO COMPLEXO PEPTÍDEO-ZINCO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Peptídeos com atividade antimicrobiana

Inúmeros agentes antimicrobianos estão disponíveis hoje para o tratamento de diferentes tipos de infecções. Entretanto, o uso indiscriminado desses agentes, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, assim como na agricultura, contribuiu para o desenvolvimento de microrganismos resistentes. A resistência antimicrobiana impulsiona uma busca urgente por alternativas aos antibióticos convencionais (Moretta *et al.*, 2021; Talapko *et al.*, 2022).

Essa busca levou ao interesse por peptídeos antimicrobianos, que são fragmentos de proteínas naturalmente produzidas por todos os tipos de organismos vivos como componentes indispensáveis de sua imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa contra o ataque de microrganismos. Os peptídeos antimicrobianos naturais podem possuir atividade de amplo espectro contra várias classes de bactérias, leveduras, fungos, vírus e parasitas, ao desempenharem ações que podem ser bacteriostáticas, microbicidas e citolíticas (Li, Xin *et al.*, 2022; Moretta *et al.*, 2021).

A capacidade de um peptídeo antimicrobiano por meio de vários mecanismos e vias aumenta sua potência e reduz a resistência; um fármaco que funciona por meio de diversas vias minimiza a possibilidade de as bactérias adquirirem múltiplas mutações simultaneamente. Ademais, como muitos desses peptídeos têm como alvo componentes da membrana celular evolutivamente conservados, as bactérias precisam remodelar completamente suas membranas, o que exige inúmeras mutações ao longo de um período prolongado (Alzain *et al.*, 2025).

Muitos desses peptídeos são produzidos por peixes. A tilápia (*Oreochromis niloticus*), produz peptídeos antimicrobianos como parte do seu sistema imune, como a piscidina, defensina, hepsidina e catelicidina as quais possuem atividade antimicrobiana e são importantes para manter feridas livres de infecções (Tozetto *et al.*, 2025).

1.1.2 Complexos de peptídeos com metais

Compostos à base de metais representam novas alternativas farmacêuticas para o tratamento de diversas doenças. complexos metálicos associados a peptídeos antimicrobianos frequentemente apresentam diferentes mecanismo de ação em relação a peptídeos sozinhos, como a destruição de membranas plasmáticas bacterianas, bem como a clivagem hidrolítica ou oxidativa de ácidos nucleicos promovida por compostos à base de metais. Esses mecanismos têm despertado interesse significativo devido à ampla gama de aplicações de matrizes de peptídeo metálicas. A função de nuclease está envolvida em uma variedade de funções biológicas, incluindo síntese de ácidos nucleicos, recombinação, regulação, processamento e degradação, portanto, o desenvolvimento de complexos metálicos de baixo peso molecular como “nucleases artificiais” é de crucial importância. Para a maioria das metalonucleases naturais, o Mg^{2+} é o íon mais adequado devido à sua alta disponibilidade natural e acidez de Lewis, mas vários exemplos envolvendo Zn^{2+} , Ca^{2+} e outros metais foram relatados: nesses estudos, o íon metálico promove a hidrólise da cadeia principal de fosfato do ácido nucleico (Natale *et al.*, 2020).

1.2.3 Zinco

O zinco é um micronutriente essencial e desempenha importantes funções no organismo na divisão celular, na regulação da expressão gênica, no sistema imune e auxilia no reparo de feridas. O zinco participa de diferentes fases do reparo de feridas, pois aumenta a agregação plaquetária, participa na proliferação de queratinócitos, no processo de reepitelização da pele e no reparo da matriz extracelular. Além disso, é conhecido que o zinco apresenta atividade antimicrobiana. Os íons de zinco (Zn^{2+}) agem tanto como antibacterianos quanto como antifúngicos. Concentrações deste íon acima de 10^{-4} M são citotóxicas para procariotos (Lin *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2021; Pasquet *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021).

Óxido de zinco, dióxido de titânio e prata são usados para controlar o crescimento microbiano. Entretanto, o óxido de zinco possui a maior atividade fotocatalítica entre os materiais inorgânicos fotocatalíticos e é mais biocompatível. Esse material já demonstrou atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (da Silva *et al.*, 2019)

Peptídeos complexados com zinco são novos compostos organometálicos que possuem várias atividades biológicas descritas, como atividade antimicrobiana. Entretanto, ainda há poucos estudos sobre as fontes e os processos de obtenção desses complexos, bem como existem poucos dados acerca do potencial antimicrobiano. Assim, é necessário que mais estudos sejam realizados para avaliar os métodos de produção desses materiais (Lin et al., 2019; Meng et al., 2021).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Sintetizar um complexo de peptídeo de tilápia com zinco para avaliar sua atividade antimicrobiana;

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar um complexo de peptídeo hidrolisado de tilápia com zinco;
- Caracterizar esse complexo por FTIR e DRX;
- Avaliar a atividade antimicrobiana deste complexo frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas;

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Obtenção do peptídeo hidrolisado de tilápia (*Oreochromis niloticus*)

O peptídeo hidrolisado de tilápia foi obtido na Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Campus Jandaia do Sul, Departamento de Engenharia Agrícola, a partir do processo de hidrólise da pele de tilápia com a enzima alcalase. Este processo de hidrólise foi depositado na patente de número BR1020240042859. Após esta etapa, foi obtido o hidrolisado de pele de tilápia total o qual foi filtrado para retenção de partículas insolúveis. Ao produto líquido foi adicionado sorbato de potássio a 0,2% para conservação microbiológica (Figura 1).

Figura 1 - Amostras de hidrolisado de tilápia na forma de líquido.



Fonte: a autora.

Feito isto, o hidrolisado líquido foi seco em liofilizador para obtenção de um pó (Figura 2) e facilitar a adição do insumo farmacêutico ativo a formulações farmacêuticas. O hidrolisado seco foi mantido em geladeira até o momento de uso.

Figura 2 - Amostras de hidrolisado de tilápia sendo secas no liofilizador.



Fonte: a autora.

1.3.2 Obtenção do complexo peptídeo-zinco

O Complexo peptídeo-zinco (PHT-Zn) foi preparado de acordo com o método descrito por Meng *et al.*, (2021) e com adaptações segundo Wang *et al.*, (2015). Para tanto foram preparados 50 mL de duas soluções em água destilada: a) solução de ZnSO_4 $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e b) solução de peptídeo hidrolisado de tilápia (PHT) a 2% (m/V).

Ambas as soluções foram misturadas em b quer e levadas para agitação em agitador magnético a 40  C por 1 hora. O pH medido da solução resultante foi 6,0, sendo este o pH ideal descrito pelas referências. Decorrido este tempo a solução foi resfriada em banho de gelo por 15 minutos e em seguida foi centrifugada a frio (4  C) a 5000 rpm por 23 minutos. O precipitado foi separado como precipitado 1 (PPT 1). Ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto na proporção 1:4 (v:v; sobrenadante:EtOH). A suspensão resultante foi deixada em banho de gelo por 1 hora e em seguida levada para um novo ciclo de centrifugação a 5000 rpm por 23 minutos a 4  C. O sobrenadante foi separado e o precipitado obtido foi denominado de Precipitado 2 (PPT2:PHT-Zn). Este, o qual é o precipitado de interesse, foi lavado com etanol 80% por 3 vezes e em cada uma houve um ciclo de centrifugação a 5000 rpm por 2 min. Os sobrenadantes da etapa de lavagem foram descartados e o precipitado limpo foi ressuspendido em água e guardado para secagem por liofilização. A liofilização ocorreu por uma semana até a obtenção de um pó fino e esbranquiçado. Após o processo de secagem, o rendimento do complexo foi calculado usando a fórmula abaixo:

$$Rendimento (\%) = (M_{final}/M_{inicial}) \times 100$$

Sendo,

M inicial = massa pesada de sulfato de zinco + massa pesada de peptídeos;

M final = massa obtida de p  após liofilização.

1.3.3 Caracterização do complexo por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR)

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas usando espectr metro IR Prestige 21 (SHIMADZU, Quito, Japão). Estas análises foram conduzidas para avaliar as principais interações químicas no complexo peptídeo-zinco e para confirmar a complexação. O espectro foi obtido utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 scan.min⁻¹ e em temperatura ambiente. O peptídeo hidrolisado de tilápia (PHT) foi analisado para fins de comparação.

1.3.4 Análise do complexo por Difração de Raios-X

A amostra foi examinada por difração de raios X em difratômetro Shimadzu XRD-6000, scan de 2 °/min e 2 θ de 3° a 80°, radiação K α de cobre (θ = 1.5418 Å), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade. O peptídeo hidrolisado de tilápia (PHT) foi analisado para fins de comparação.

1.3.5 Avaliação do potencial antimicrobiano do complexo PHT-Zn

O potencial antimicrobiano foi avaliado por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição seriada de acordo com o CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais).

1.3.5.1 Preparo dos inóculos

As bactérias testadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25392) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Foram preparados 3 mL de pré-inóculo de cada bactéria em caldo Mueller-Hilton. Estes foram incubados em estufa 28 °C 12 h antes do preparo do inóculo. As densidades ópticas (DO) foram medidas até se chegar em DO = 0,4. Feito isto, os pré-inóculos foram diluídos 1:10 em Mueller-Hilton para preparar os inóculos. Estes foram deixados em agitação em *shaker* a 100 rpm e 37 °C até que o crescimento bacteriano chegasse em DO = 0,4.

1.3.5.2 Preparo das diluições de PHT-Zn e ZnSO₄

As diluições foram feitas em placas de 96 poços, em sextuplicata, a partir de uma solução-mãe a 30 mg/mL solubilizada em água estéril. O branco foi feito em triplicata contendo apenas amostra diluída. Às sextuplicatas foram adicionadas 20 μ L do inóculo de bactéria. O controle negativo foi feito contendo apenas a bactéria e o controle positivo contendo bactéria e o antimicrobiano gentamicina 60 μ g. As concentrações avaliadas e quantidade de meio Mueller-Hilton estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1- Concentração de amostra, quantidade de amostra e de meio de cultura em cada poço.

Poço	Concentração de amostra (mg/mL)	Amostra (µL)	Mueller-Hilton (µL)
A	15	180 (da solução-mãe 30 mg/mL)	180
B	7,5	180	180
C	3,75	180	180
D	1,875	180	180
E	0,937	180	180
F	0,468	180	180
G	0,234	180	180
H	0,117	180	180

Fonte: a autora.

As placas foram deixadas em estufa a 37 °C por 24 horas e em seguida o crescimento bacteriano foi avaliado em equipamento leitor Synergy™ a 630 nm. A porcentagem de inibição foi definida pela seguinte fórmula:

$$\text{Crescimento Relativo (\%)} = (\text{Crescimento final} \times 100) / \text{Controle negativo}$$

$$\text{Inibição Relativa (\%)} = 100 - \text{Crescimento Relativo (\%)}$$

A CIM foi definida como a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano.

1.3.5.3 Análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As concentrações da análise anterior que não apresentaram crescimento bacteriano visível foram plaqueadas em placas de Petri com ágar Mueller-Hilton para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). As placas de Petri foram encubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A CBM foi definida como sendo a concentração mínima dentre as testadas em que não houve crescimento bacteriano nas placas. As

concentrações em que houve desenvolvimento de colônias bacterianas foram consideradas bacteriostáticas e não bactericidas.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1 Obtenção do complexo peptídeo-zinco (PHT-Zn)

Após a secagem do complexo por liofilização, obteve-se um pó branco fino (Figura 3). O rendimento foi calculado e considerando a massa inicial dos compostos utilizados, o rendimento médio obtido foi de 37,67%.

Figura 3 - Complexo PHT-Zn após centrifugação e após liofilização



Fonte: a autora.

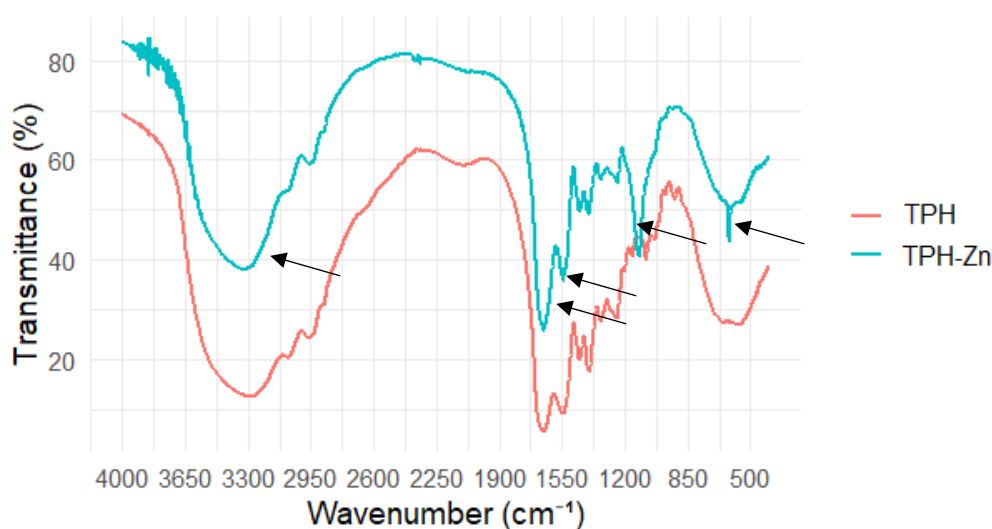
O rendimento do complexo de 37,67% foi menor do que o esperado, sendo necessárias adaptações do método de complexação para se obter mais produto. O complexo estudado por Meng *et al.* (2021) foi obtido através de peptídeos de colágeno de tilápia com massa molecular média de 1653 Da, os quais são fragmentos maiores do que os fragmentos peptídicos identificados na amostra PHT usada no presente trabalho. A amostra PHT é composta majoritariamente por dipeptídeos e tripeptídeos, como identificado por Tozetto *et al.* (2023). Isso torna a amostra PHT mais solúvel do que a estudada por Meng *et al.* (2021), dificultando a precipitação desta com etanol e, consequentemente, dificultando a separação deste precipitado por centrifugação. Uma alternativa para melhorar o rendimento é alterar o solvente utilizado na etapa de precipitação, o qual foi o etanol, para um solvente mais apolar, como acetato de etila ou acetona. Também são necessários estudos sobre a capacidade quelante de zinco, para conhecer a real proporção desse complexo em relação ao PHT:Zn^{2+} . Em estudos anteriores em que complexos de peptídeos com zinco foram obtidos a fim de melhorar

a biodisponibilidade de zinco na dieta, obteve-se uma capacidade quelante de zinco média de 46,6% quando complexado com caseína e 68,25% quando complexado com proteínas do gérmen de trigo (Udechukwu; Collins; Udenigwe, 2016).

1.4.2 Caracterização do complexo

Alterações nas bandas do espectro de FTIR (Figura 4) são sugestivas da interação de Zn^{2+} com grupos orgânicos dos peptídeos. Comparado ao espectro de PHT o comprimento de onda em 1400 cm^{-1} para COO^- se moveu para maiores frequências e o grupo $-\text{COOH}$ provavelmente se alterou para $-\text{COO-Zn}$. Essas alterações também foram visíveis no complexo de peptídeo de tilápia com zinco produzido por Meng et al. (2021).

Figura 4 - Espectro de FTIR do complexo PHT-Zn e do PHT.



Fonte: a autora.

Alterações nas bandas de amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e amida II ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) após complexação com Zn^{2+} indicam a participação dos grupos carbonila (C=O) e amida (N-H/C-N) na coordenação metálica (Bandara *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2021; Usoltsev *et al.*, 2019). Mudanças adicionais na região de 3300 cm^{-1} sugerem o envolvimento de grupos hidroxila e amina, enquanto variações na região de $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ indicam possível contribuição de grupos carboxilato. Esses resultados

confirmam a formação de um complexo peptídeo–zinco. As bandas absorvidas na faixa de $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas ao estiramento do grupo C=O acopladas com bandas de dobramento de N-H (Chen; Shen; Xia, 2020). As bandas na faixa de $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ são provavelmente causadas pelo dobramento de N-H com o estiramento de C-N . A banda na faixa de 1400 cm^{-1} é causada pelo grupo carboxilado -COO^- e houve alteração na complexação, indicando que este grupo pode estar envolvido na interação com o zinco (Chen; Shen; Xia, 2020; Meng *et al.*, 2021). A tabela abaixo (Tabela 2) mostra as principais bandas observadas nos espectros da Figura 4.

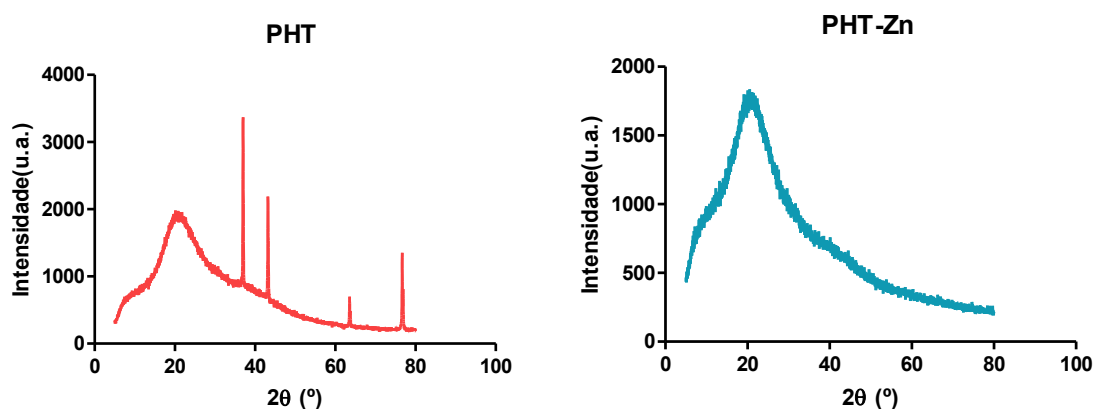
Tabela 2 – Alterações nas bandas de infravermelho identificadas no complexo PHT-Zn quando comparadas às bandas encontradas para a amostra PHT.

Região (cm^{-1})	Atribuição	Alteração observada (TPH $\rightarrow$ TPH-Zn)	Interpretação	Referências
~3300	Estiramento N-H (amida A) e O-H	Diminuição de intensidade / leve deslocamento	Envolvimento de grupos N-H e O-H na coordenação com Zn^{2+}	Barth, (2007); Kong; Yu, (2007)
~2920–2850	Estiramento C-H alifático	Pequenas alterações	Mudanças estruturais indiretas (não diretamente envolvido na coordenação)	Socrates (2001)
~1650	Amida I (C=O)	Deslocamento e redução de intensidade	Coordenação do Zn^{2+} com oxigênio carbonílico	Bandara et al. (2018); Usoltsev et al. (2019)
~1540–1550	Amida II ($\text{N-H} + \text{C-N}$)	Alteração de intensidade / deslocamento	Participação do nitrogênio amídico na ligação com Zn^{2+}	Bandara et al. (2018); Usoltsev et al. (2019)
~1400–1200	COO^- (carboxilato) e C-N	Mudanças no perfil espectral	Envolvimento de grupos carboxilato na coordenação metálica	Nakamoto (2009)
~600–500	Vibrações Zn-O / Zn-N	Alterações/possível aparecimento	Formação de ligações metal–ligante	Nakamoto (2009)

Fonte: a autora.

A difração de raios X (DRX) pode ser usada para determinar a estrutura espacial de quelatos. Quando raios X de certos comprimentos de onda são irradiados sobre uma substância cristalina, eles serão dispersos por átomos ou íons encontrados em um arranjo regular no cristal (Li, Chen *et al.*, 2020). Os padrões de difração (Figura 5) mostraram que houve mudança na estrutura do peptídeo PHT quando complexado com zinco, reforçando que o método foi eficiente para obtenção de complexos de peptídeo-zinco. Enquanto o peptídeo isolado (PHT) mostrou picos de difração correspondentes a formas cristalinas (próximos a $2\theta = 40^\circ$ e 80°), o complexo PHT-Zn se mostrou completamente amorfo com uma absorção presente em $2\theta = 20^\circ$.

Figura 5 - DRX do complexo PHT-Zn e do PHT.



Fonte: a autora.

1.4.3 Avaliação do potencial antimicrobiano

O complexo PHT-Zn apresentou CIM de 3,75 mg/mL contra *E. coli* (ATCC 25922), o dobro da concentração atingida em outros estudos publicados na literatura (Lin, Yanlan *et al.*, 2019a), o qual também demonstraram ter atividade antibacteriana dose-dependente.

A mesma CIM de 3,75 mg/mL foi observada contra *S. epidermidis* (ATCC 35984) tratada com PHT-Zn. Já para *S. aureus* (ATCC 25392) a CIM foi de 1,875 mg/mL, a menor deste estudo para o complexo PHT-Zn. Contra *P. aeruginosa* (ATCC 27853), a CIM foi de 15 mg/mL (Figuras 6 e 7).

Em avaliação anterior deste mesmo peptídeo hidrolisado de tilápia, obteve-se essa mesma concentração de 3,75 mg/mL como CIM para *E. coli*, porém sem o

processo de complexação. Neste mesmo estudo, a mesma concentração foi encontrada como CIM para *S. aureus* (Tozetto *et al.*, 2023). A complexação deste peptídeo com zinco apresentou melhora na atividade antimicrobiana apenas para *S. aureus*, a qual CIM reduziu pela metade.

Em um estudo sobre a atividade antimicrobiana de um peptídeo isolado da pele do peixe cavalinha, o collagencin, foi possível observar inibição completa dos microrganismos *Escherichia coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophyla* ATCC7966 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 quando tratados com 235 μ M de collagencin (Ennaas *et al.*, 2016).

Os peptídeos com atividade antimicrobiana representam agentes promissores para o tratamento de feridas infectadas, por poderem possuir tanto atividade cicatrizante quanto antimicrobiana (Huang *et al.*, 2015). Em um estudo feito por Lin *et al.* (2019) peptídeos de polvo complexados com zinco demonstraram atividade antimicrobiana contra *E. coli* pelo método de disco difusão, apresentando halo de inibição de $339.75 \pm 18.47\text{mm}^2$, enquanto o halo de inibição do sulfato de zinco foi menor ($254.84 \pm 31.97\text{mm}^2$). Já para o teste de microdiluição, este complexo apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 1,88 mg/mL contra a mesma bactéria.

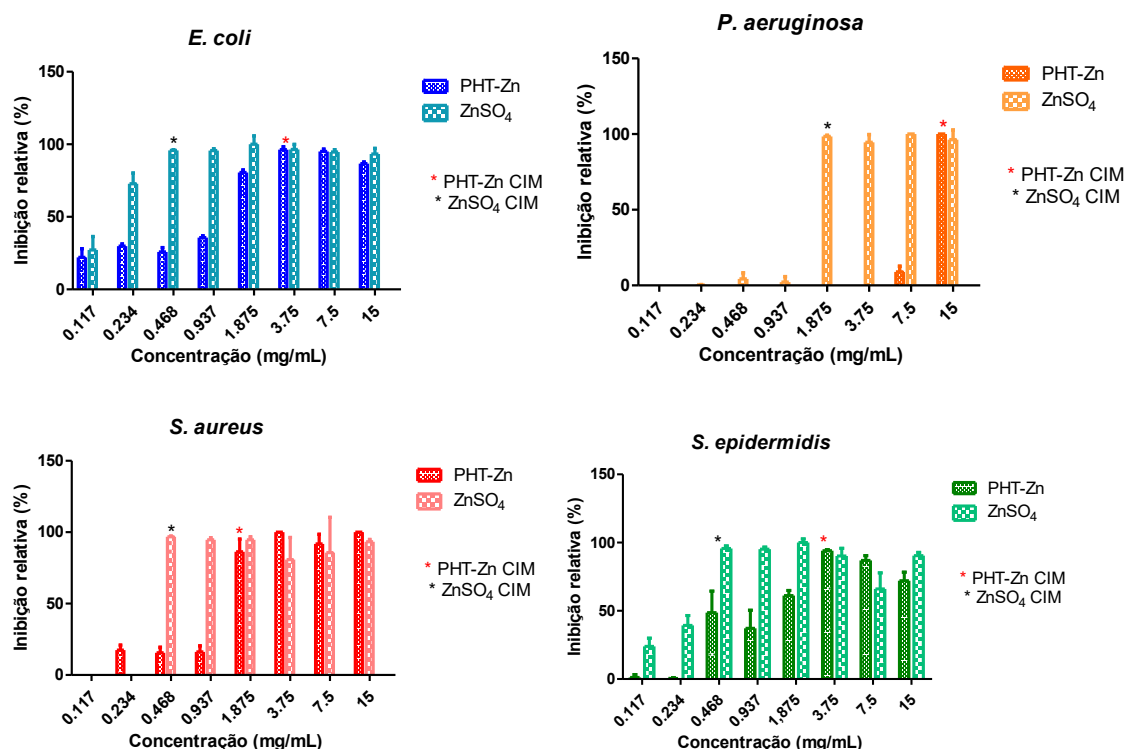
Figura 6 - Placas após 24h em estufa a 37 °C.



Fonte: a autora.

O peptídeo de tilápia piscidina-3 (TP3) é um peptídeo de 23 aminoácidos formador de poro com estrutura em α -hélice que confere atividade citolítica contra bactérias e possui atividade tanto contra gram-negativas quanto contra gram-positivas (Huang *et al.*, 2015).

Figura 7 - Gráficos de inibição dos microrganismos.

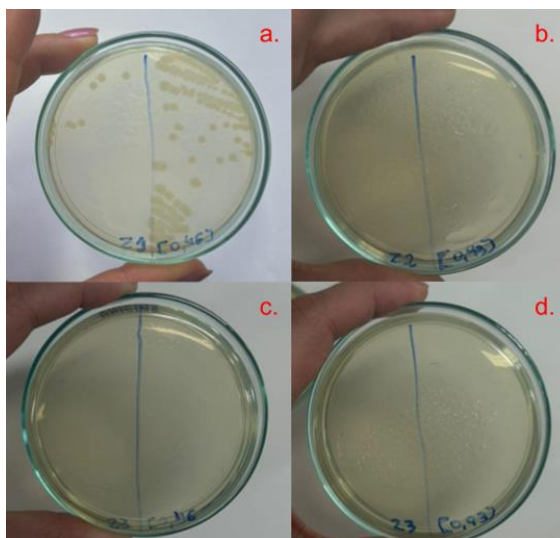


Fonte: a autora.

Avaliação da atividade antimicrobiana de peptídeos de tilápia por disco-difusão mostrou baixa atividade contra *E. coli* e *S. aureus*, apresentando halo de inibição de 0,08 mm e 0,5 mm, respectivamente (Ouyang *et al.*, 2018). Os resultados da atividade antimicrobiana do PHT não foi reprodutível do encontrado por Tozetto *et al.* (2023) o qual obteve inibição contra *E. coli* e *S. aureus* de mais de 95% em 3,75 mg/mL.

O complexo PHT-Zn apresentou crescimento da CIM quando plaqueadas em meio sólido durante o teste de concentração bactericida mínima (CBM), mostrando que o complexo é bacteriostático, mas não bactericida. Já o ZnSO₄ apresentou CBM de 0,93 mg/mL contra *S. epidermidis* e de 0,468 mg/mL contra *S. aureus* (Figura 8).

Figura 8 - Crescimento dos microrganismos após plaqueamento das amostras com zinco isolado. (a) Amostra com 0,468 mg/mL de ZnSO_4 – *Escherichia coli*; (b) amostra com 0,93 mg/mL de ZnSO_4 – *Staphylococcus epidermidis*; (c) amostra com 0,468 mg/mL de zinco – *Staphylococcus aureus*; (d) amostra com 0,93 mg/mL de ZnSO_4 – *Staphylococcus aureus*.



Fonte: a autora.

É importante notar que uma maior resistência microbiana está presente em bactérias Gram-negativas do que Gram-positivas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* usadas neste teste. Muitos antibióticos de primeira linha, como vancomicina e rifampicina, não são usados contra esses microrganismos. O problema principal é a presença do lipopolissacarídeo (LPS) e de purinas na membrana externa de Gram-negativos que limita a entrada e ação de agentes antimicrobianos (Talapko *et al.*, 2022). A CIM do complexo PHT-Zn contra *E. coli* de 3,75 mg/mL, por mais que maior que a observada por outros complexos contra esta bactéria, pode ser vista como promissora.

A presença de infecções em feridas crônicas é um fator limitante da cicatrização e contribui para o atraso da cura. A presença de biofilmes pode estar envolvida com essas infecções. O biofilme é uma comunidade bacteriana estruturada em uma matriz polimérica extracelular. Mais de 90% das feridas crônicas contaminadas possuem bactérias vivendo em biofilme (Shen *et al.*, 2025). Biofilmes são encontrados em cerca de 70% de úlceras de pé diabético, principalmente envolvendo bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* e *S. aureus* são bactérias formadoras de biofilmes comumente envolvidas em feridas por queimadura. *S. aureus*, por ser comumente encontrado em pele saudável, se aproveita da ruptura da pele durante o processo de queimadura para formar biofilmes resistentes (Shen *et al.*, 2025). Devido ao complexo ter apresentado atividade bacteriostática, mas não

bactericida, é interessante avaliar a sua atividade contra a formação de biofilme destas bactérias.

CAPÍTULO 2 – HIDROGÉIS CONTENDO PEPTÍDEO DE PELE DE TILÁPIA: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E ENSAIOS CLÍNICOS

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1 Pele e anexos cutâneos

A pele é o maior órgão dos mamíferos e compreende 10% da massa corpórea e consiste em duas camadas, sendo elas a epiderme e a derme, sendo sustentada por um tecido conjuntivo frouxo. A epiderme é formada por queratinócitos, melanócitos, células dentríticas, células de Langerhans e outras células imunes. A derme possui em sua estrutura os anexos cutâneos, mastócitos, fibroblastos, células imunes residentes e circulantes e a matriz extracelular (MEC) que fornece suporte intercelular e regula as funções de citocinas e fatores de crescimento (Borena *et al.*, 2015; Cañedo-Dorantes; Cañedo-Ayala, 2019; Gushiken *et al.*, 2021).

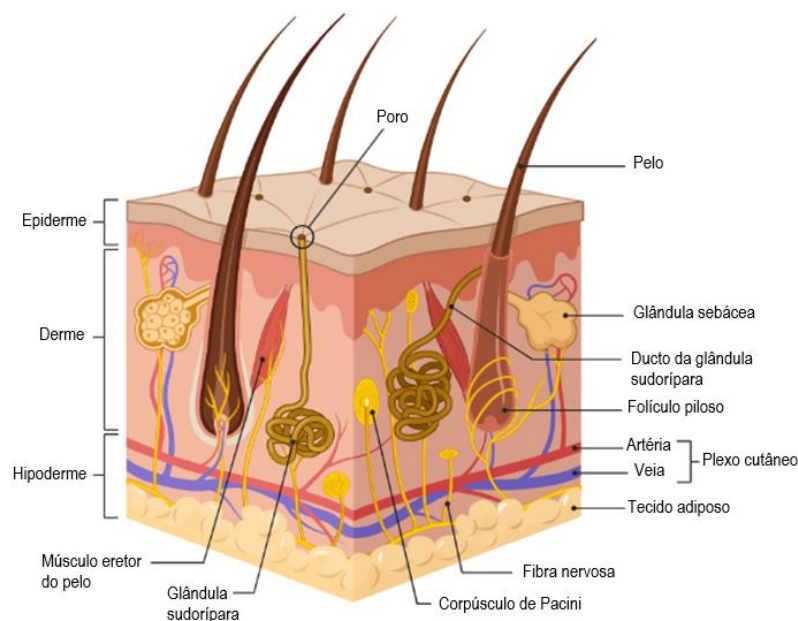
Entretanto, existem diferenças entre a anatomia e estrutura dessas camadas entre cada espécie, o que resulta em diferenças no processo de reparo das feridas. Em animais com mais tecido conjuntivo frouxo, o reparo é mais rápido ocorrendo por contração da ferida iniciado pelo músculo *Panniculus carnosus*, como em ratos e camundongos, enquanto em animais de pele mais firme, como humanos e porcos, que não possuem esse músculo, a contração da ferida não é rápida e o reparo da pele vem por reepitelização. Essas diferenças no processo de reparo podem ser observadas até mesmo dentro de mesmas espécies, como já foi observado em níveis macro, celular e molecular (Borena *et al.*, 2015).

O epitélio de mamíferos é estratificado escamoso consistente de 4 a 5 subcamadas (ou estratos), sendo elas, da mais profunda para a mais superficial, camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal varia em vários mamíferos, podendo conter uma ou várias camadas de células cuboides de núcleos grandes e pouco citoplasma (Akat *et al.*, 2022). O estrato espinhoso possui uma ou duas camadas de células em regiões da pele com pelos em camundongos, cães e gatos, podendo chegar a quatro em humanos. As principais diferenças entre humanos e a maioria dos mamíferos domésticos e de laboratório dizem respeito aos anexos, como a presença de vibrissas com função tátil em animais domésticos como cães e gatos (Souci; Denesvre, 2021).

A barreira da epiderme intacta depende da qualidade das células presentes e da matriz que as circundam. A epiderme e a derme são separadas pela membrana ou lâmina basal, que é uma camada rica em MEC especializada. Além de proporcionar adesão estrutural entre ambas as camadas a membrana basal regula a difusão de células e moléculas bioativas. Assim, serve como um reservatório para citocinas e fatores de crescimento liberando-as de forma controlada durante o reparo após lesões (Borena *et al.*, 2015; Gushiken *et al.*, 2021).

A derme, localizada abaixo da epiderme, é composto por camadas de fibras papilhosas e reticulares. A camada papilar consiste em (i) elementos celulares, como fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas e componentes da MEC, como fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas dérmicas e (ii) componentes da MEC nomeadamente componentes do estroma (por exemplo, fibras colágenas e elásticas) e componente da matriz (glicoproteínas, proteoglicanos e macromoléculas reguladoras de células). A camada reticular é composta por colágeno fibras elásticas e fibroblastos. A derme é vascularizada, enervada e possui anexos epidérmicos. Todas essas estruturas auxiliam nas características mecânicas e termorreguladoras da pele. A epiderme e seus anexos possuem origem embrionária ectodérmica enquanto os anexos da pele possuem origem da derme que derivam da mesoderme (Borena *et al.*, 2015; Gushiken *et al.*, 2021). A Figura 9 representa a estrutura da pele:

Figura 9 - Estrutura da pele.



Fonte: BioRender. (2025) BioRender.

A pele de mamíferos abriga vários microrganismos em sua superfície, formando o microbioma da pele (Souci; Denesvre, 2021). Este microbioma é importante para regular a resposta imune inata e defender a pele contra microrganismos patogênicos. A presença de dermatite atópica, tanto em humanos, como em cães, altera a microbiota da pele, com aumento da prevalência de *Staphylococcus* sp., sendo *S. aureus* mais presente em humanos e *S. pseudintermedius* em cães (Hoffmann *et al.*, 2014).

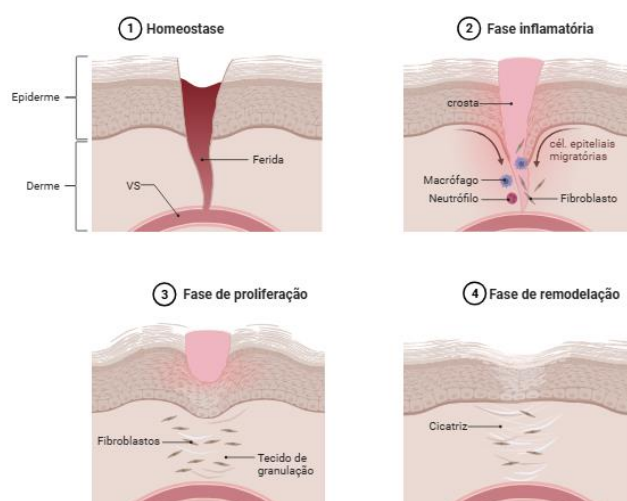
Um estudo que avaliou a microbiota da pele de cães saudáveis identificou dezessete filos de bactérias, sendo o gênero mais prevalente *Ralstonia* spp. Outros gêneros encontrados na pele de cães incluíram *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Macroccoccus* spp., and *Pseudomonas* spp. Estudos anteriores identificaram *Micrococcus* spp, *Staphylococcus* epidermidis, *S. xyosus*, *Clostridium* spp., *Propionibacterium acnes* e *Acinetobacter* spp. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., e *Pseudomonas* spp. (Hoffmann *et al.*, 2014).

2.2.2 Cura de feridas: etapas e mecanismos envolvidos

A pele é uma barreira física, química e microbiológica e a cura de feridas é um processo fundamental para manter as suas funções vitais. Qualquer distúrbio dessa distribuição anatômica pode ser considerada uma ferida ou injúria. A regulação fisiológica da cicatrização de feridas da pele é complexa e dependente de diversos tipos e mediadores celulares que interagem em uma sequência sofisticada. O principal objetivo da reparação das feridas é evitar danos maiores e a instalação de infecções ao restaurar a barreira da pele. (Borena *et al.*, 2015; Liu; Hshieh; Chen, 2022; Sorg *et al.*, 2016).

O processo de reparação de feridas é dividido em fases, as quais incluem 1) fase homeostática (onde há a formação de coágulo de fibrina, durando de segundos a 1h); 2) fase inflamatória (dura de minutos a dias); 3) fase de proliferação (ocorre proliferação de células, reepitelização, deposição do tecido de granulação e angiogênese (se inicia 18-24h após a instalação da ferida e pode durar dias e semanas) e 4) fase de remodelação (remodelação da matriz e formação da cicatriz (se inicia de 5-7 dias e dura meses a anos). Algumas fontes consideram as fases homeostática e inflamatória como pertencentes ao mesmo estágio. A Figura 10 ilustra as fases do reparo de feridas (Lin *et al.*, 2018; Gushiken *et al.*, 2021; Liu; Hshieh; Chen, 2022).

Figura 10 – Fases do reparo de feridas.



Created in BioRender.com bio

A fase inflamatória se inicia quando as células são expostas aos padrões moleculares associados a danos e/ou aos padrões moleculares associados a patógenos que são reconhecidos por receptores toll-like. Nesta fase inicial, também há ativação de plaquetas que sintetizam compostos que irão formar o coágulo de fibrina que age como uma MEC provisória durante a migração de células sanguíneas. Os granulócitos, em especial neutrófilos, migram por um gradiente de quimiocinas até o local da lesão e liberam citocinas que aumentam a resposta inflamatória (Gushiken et al., 2021; Sorg *et al.*, 2017).

Os linfócitos T regulatórios ativados auxiliam na manutenção do tecido de inflamação ao atenuar a produção de interferon- γ e a proliferação e acúmulo de macrófagos. Esse efeito é mediado pela rota do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF). Os macrófagos são células essenciais no processo de cicatrização. Estudos apontam que quando os macrófagos estão ausentes nas fases inflamatória e de proliferação, o tecido resultante é menor e pode favorecer hemorragias e afeta o avanço para a próxima fase da cicatrização. Os macrófagos residentes da pele são ativados pelos padrões moleculares associados a danos e aos associados a patógenos. Nos estágios iniciais da reparação, isso resulta na diferenciação a subclasse M1 de macrófagos, a qual está associada à atividade fagocítica e à produção de mediadores pró-inflamatórios (Sorg *et al.*, 2017). Em sequência, M1 se diferencia na subclasse M2, a qual está envolvida na síntese de mediadores anti-inflamatórios e na produção da matriz extracelular, bem na iniciação da proliferação de fibroblastos e no processo angiogênico. Além disso, macrófagos M2 servem para limpar o tecido, visto que fagocitam neutrófilos, bactérias e restos celulares para evitar que danos posteriores ocorram nas fases mais avançadas do processo de cura (Sorg *et al.*, 2017).

As feridas cutâneas se fecham por reparo epitelial e por contração da ferida. O processo de reepitelização depende da localização, profundidade, tamanho e se há contaminação microbiana da ferida. Feridas que envolvem a epiderme e parcialmente a derme, sem danificar os anexos cutâneos, cicatrizam por intenção primária. Já nas feridas de espessura total, ocorre dano total na epiderme e derme e em estruturas mais profundas. Neste caso, a reparação da perda do tecido se inicia pela formação do tecido de granulação e é denominada de cicatrização por intenção secundária. Reparação por terceira intenção é um processo complexo e muitas vezes ameaça a vida, pois a ferida pode ser deixada aberta intencionalmente até que diminua o

processo altamente inflamatório. Assim, quando o paciente é estabilizado, o fechamento da ferida se dá por sutura ou por reconstrução cirúrgica (Gushiken et al., 2021; Sorg *et al.*, 2017).

Feridas profundas e infectadas demoram mais para cicatrizar, pois os estágios iniciais da reparação da ferida demandam mais tempo para remoção de restos celulares e tecido necrótico antes da deposição do tecido de granulação. A reepitelização inicia horas após a conversão de queratinócitos estacionários em queratinócitos migratórios planos. A localização anatômica dos anexos epidérmicos parece estar configurada para o processo de reparo de feridas de forma eficiente. Um pré-requisito para uma reepitelização efetiva é a presença da MEC que facilita a migração dos queratinócitos. Com exceção da derme, outros tecidos conjuntivos necessitam da formação de um tecido de granulação para a migração das células epiteliais; este tecido de granulação é formado por macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos e uma matriz de colágeno tipo I, glicoproteína, fibronectina e ácido hialurônico (Liu, Hshieh e Chen, 2022; Sorg *et al.*, 2017).

Em lesões cutâneas, durante a regeneração epidérmica, as células ausentes são substituídas por células-tronco da protuberância dos folículos pilosos e pelo nicho da epiderme interfolicular. Em feridas crônicas, há desregulação dessas células-tronco epidérmicas causando inflamação contínua por conta de infecções, hipóxia, isquemia e exsudatos excessivos. A microvasculatura presente reduz a perda sanguínea e estabelece uma matriz provisória para a ferida. Citocinas derivadas do coágulo sanguíneo e fatores de crescimento recrutam células essenciais para o reparo da ferida. Após esse microambiente se estabelecer, novos vasos são formados para garantir que células do sistema imune cheguem ao local para remover os restos celulares e possíveis patógenos. As células tronco são responsáveis pelo alto nível de moléculas pró-angiogênicas como VEGF, HGF, bFGF, EGF, TGF-beta, IGF-1 (Sorg *et al.*, 2017).

Os miofibroblastos são importantes na contração da ferida. Após a instalação da ferida, fibroblastos encontrados na margem da ferida são ativados por fatores de crescimento. Estas células se diferenciam em protomiofibroblastos ao serem estimulados por tensão mecânica e pela liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Estes protomiofibroblastos são encontrados no início do tecido de granulação e em tecidos conjuntivos normais. Tensão mecânica, TGF-beta e fibronectina EDA estimulam protofibroblastos a se diferenciarem em miofibroblastos.

Os miofibroblastos exercem sua função contráctil ao ligar o seu citoesqueleto com a MEC. A remodelação da cicatriz pode levar de meses a anos para formar uma cicatriz madura (Sorg *et al.*, 2017).

A formação da cicatriz compreende a última fase do reparo da ferida, a fase da remodelação. O fechamento da ferida e a substituição do tecido original se dá pela formação de uma cicatriz colagenosa. Na derme, o padrão da matriz de colágeno é reticular. Cicatrizes cutâneas não possuem anexos epidérmicos e possui um padrão de colágeno que é diferente do encontrado em um tecido sem lesão. Fibras de colágeno secretadas pelos fibroblastos aparecem em torno de 3 dias após a ferida e conforme a matriz é secretada, uma rede densa de fibras de colágeno se deposita no local para preencher o tecido lesionado. Assim, o padrão de colágeno encontrado em cicatrizes é de um colágeno fibroso ao invés do colágeno reticular encontrado em tecidos intactos (Gushiken *et al.*, 2021; Sorg *et al.*, 2017; Tottoli *et al.*, 2020).

Os fatores de crescimento são importantes agentes regulatórios no processo de reparo. Eles são polipeptídeos secretados por células encontradas na ferida e atuam na diferenciação celular e recrutando novas células para atuarem no local. O PDGF liberado por plaquetas atrai neutrófilos, macrófagos e fibroblastos que sintetizam nova MEC induzindo a formação do tecido de granulação. Na maioria das feridas, existem sinais de paradas que sinalizam que a derme foi reparada e fechada, interrompendo processo de reparação. Entretanto, existem casos em que os sinais são ineficazes levando à formação de cicatrizes excessivas. Isso pode se dar por superexpressão de citocinas, redução da atividade da collagenase, falta de mecanismos apoptóticos e a presença contínua de fibroblastos ativados. Cicatrizes hipertróficas e quelóides são raros em animais e mais frequente em humanos. Os géis de silicone são amplamente utilizados para redução da cicatriz e os mecanismos de ação propostos são melhora da hidratação e oclusão, aumento da temperatura e mudança na tensão mecânica da cicatriz (Sorg *et al.*, 2017).

Vale colocar que em mamíferos, a pele dos fetos se regenera de forma perfeita em comparação com a pele de adultos. A pele de mamíferos adultos possui uma capacidade limitada de se regenerar, enquanto em embriões e fetos o tecido é reparado de forma completa sem a formação de cicatriz. A cura das feridas em feto envolve reações inflamatórias menos intensas e a produção dos componentes da MEC é mais rápida, com alta concentração de ácido hialurônico. O perfil da expressão dos fatores de crescimento neste caso também é diferente (Borena *et al.*, 2015).

De modo específico em cachorros e gatos, a cura de feridas inclui diferentes padrões na formação de tecido de granulação, uma menor produção de tecido de granulação e epitelização, redução na contração do tecido e uma menor resistência do tecido cicatricial em gatos. Esses processos podem ser explicados devido às diferenças no angiossoma cutâneo (áreas supridas por vasos sanguíneos específicos) e porque cachorros produzem uma resposta inflamatória antecipada. Comparados aos gatos, os cães possuem maior densidade de vasos de ordem terciária ou de maior ordem. Em relação à formação do tecido de granulação, em cães o início se dá no meio da ferida e pode cobri-la totalmente com uma coloração vermelha intensa, enquanto em gatos o início acontece na periferia da ferida e se direciona até o centro com uma coloração mais pálida. Outra particularidade é a formação de pseudo cicatrização (tecido aparentemente curado na superfície, mas com deficiência em cura no tecido abaixo) em gatos, que pode se dar pelo atraso na formação de colágeno e a presença de colágeno imaturo (Lux, 2022).

As bactérias mais documentadas em infecções cirúrgicas em cães e gatos são *Staphylococcus* sp., as quais são patógenos oportunistas. Uma bactéria comum de infectar feridas de cães e gatos é a *Staphylococcus pseudintermedius*, a qual produz biofilme (Lux, 2022).

Feridas cutâneas de maior complexidade podem comprometer gravemente o tecido local, comprometendo a homeostasia e levando ao risco de perda de função, assim intervenções clínicas são necessárias. O tratamento clínico de feridas de pele é importante para reestruturar o local lesionado de forma rápida, mantendo suas funções e características estéticas satisfatórias (Borena *et al.*, 2015).

As terapias para feridas cutâneas podem ser separadas em terapias convencionais e terapias regenerativas. As terapias convencionais abordam o desbridamento do tecido necrótico seguido pelo uso de diferentes curativos para reduzir a pressão e infecções na ferida. As feridas tratadas por esse manejo formam cicatrizes e muitas vezes pode haver comprometimento funcional, ficando mais sensíveis à radiação UV e não restaurando os anexos epidérmicos (glândulas sudoríparas e folículos sebáceos). A terapia regenerativa é uma abordagem amplamente estudada que visa reparar o tecido cutâneo danificado sem a instalação de cicatrizes. Entre técnicas da terapia regenerativa estão terapias baseadas em fatores de crescimento e as terapias baseadas em células (Borena *et al.*, 2015; Tottoli *et al.*, 2020).

Os fatores de crescimento são indispensáveis para a interação célula-célula e célula com a matriz durante o reparo tecidual, entretanto as terapias que usam fatores de crescimento não levam em conta as interações entre diferentes tipos de fatores de crescimento durante a cura da ferida. Abordagens terapêuticas para o tratamento de feridas de pele demandam o uso repetido de fatores de crescimento exógenos e suas altas concentrações podem ocasionar efeitos adversos em feridas crônicas. Algumas considerações acerca da terapia baseada em células envolve a idade do animal doador, a dose e a via de administração das células para o tratamento de feridas de pele (Borena *et al.*, 2015; Tottoli *et al.*, 2020).

Queimaduras leves não requerem enxerto e se bem tratadas cicatrizarão espontaneamente. Queimaduras mais graves podem necessitar da substituição da barreira epidérmica por novas células, muitas vezes obtidas por enxertos de pele convencionais, por aplicação de suspensão de queratinócitos ou por substitutos dermo-epidérmicos. Enxertos de pele parcial não regeneram os anexos epidérmicos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas). Substitutos de pele acelulares recrutam tecido fibrovascular do leito da ferida e são formados por biopolímeros, como colágeno, ácido hialurônico, elastina e sulfato de condroitina. Entretanto, esses materiais biológicos citados são passíveis de contaminação microbiana e necessitam de agentes antimicrobianos devido à sua função como ligantes biológicos para bactérias (Boyce; Lalley, 2018).

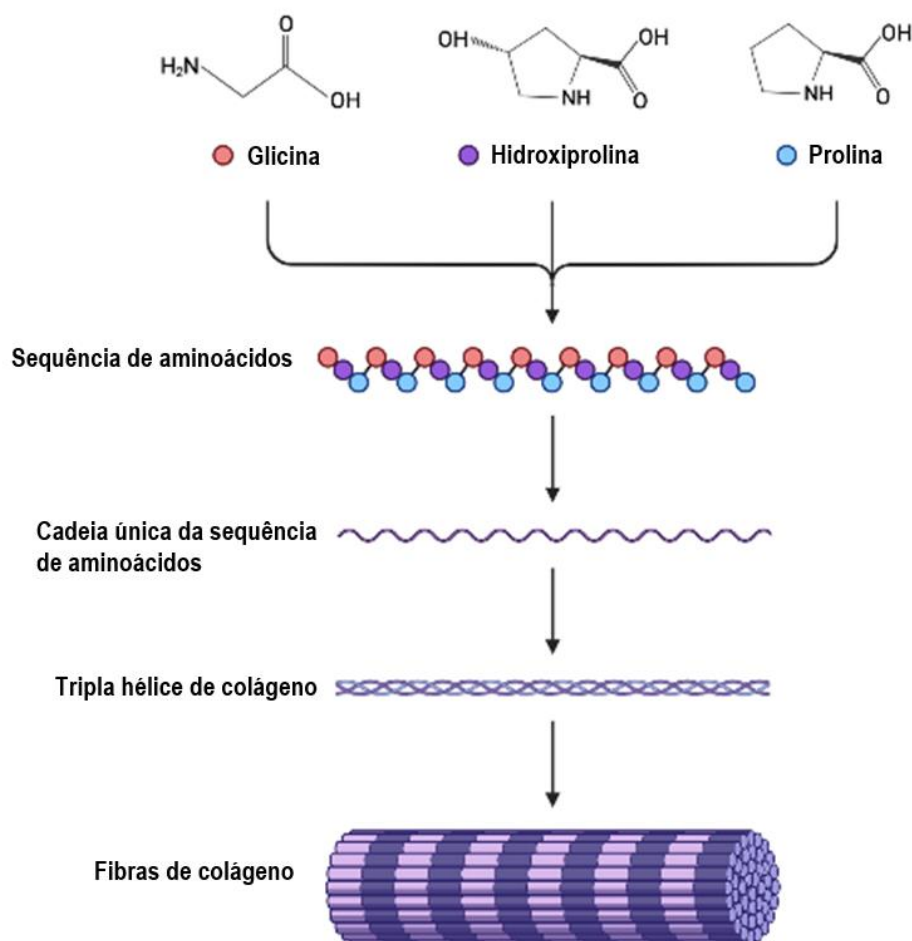
2.2.3 Colágeno

O colágeno é o componente mais importante da matriz extracelular da pele e a proteína estrutural mais abundante no tecido conjuntivo de mamíferos, representando 30% da proteína animal. Este material pertence ao grupo das proteínas fibrilares responsáveis por manter a estrutura do tecido conjuntivo nos mamíferos sendo encontrado na pele, em tendões, cartilagem, ossos, músculos, vasos sanguíneos ou córnea (Wang, Kuiming; Cao; Dong, 2025).

Existem aproximadamente 29 tipos de colágeno diferenciados por algarismos romanos I-XXIX em ordem de sua descoberta. Os mais encontrados dentre os 29 são tipo I (pele, tendões, músculos, ossos), tipo II (cartilagem), tipo III (geralmente perto do tipo I) e tipo IV (membrana basal) (Wang *et al.*, 2025). Os aminoácidos mais abundantes em sua estrutura molecular são prolina (Pro), hidroxiprolina (Pro-OH),

glicina (Gly) e hidroxilisina (Lys-OH). Essa estrutura se baseia numa tripla hélice a qual se estabiliza por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals. A sua estrutura primária se caracteriza pela repetição da sequência Gly-X-Y, em que X e Y geralmente são Pro e Pro-OH (Figura 11). As cadeias da tripla hélice podem ser idênticas e formar homotrímeros (colágeno tipos II, III, VII, VIII e X) ou diferentes e formar heterotrímeros (colágeno tipos I, IV, V, VI, IX e XI). As fibrilas de colágeno se agregam para formar fibras maiores, as quais contribuem para as propriedades mecânicas dos tecidos, conferindo flexibilidade, resistência e força (Wang; Cao; Dong, 2025; Wosicka-Frackowiak *et al.* 2024).

Figura 11 - Estrutura do colágeno.



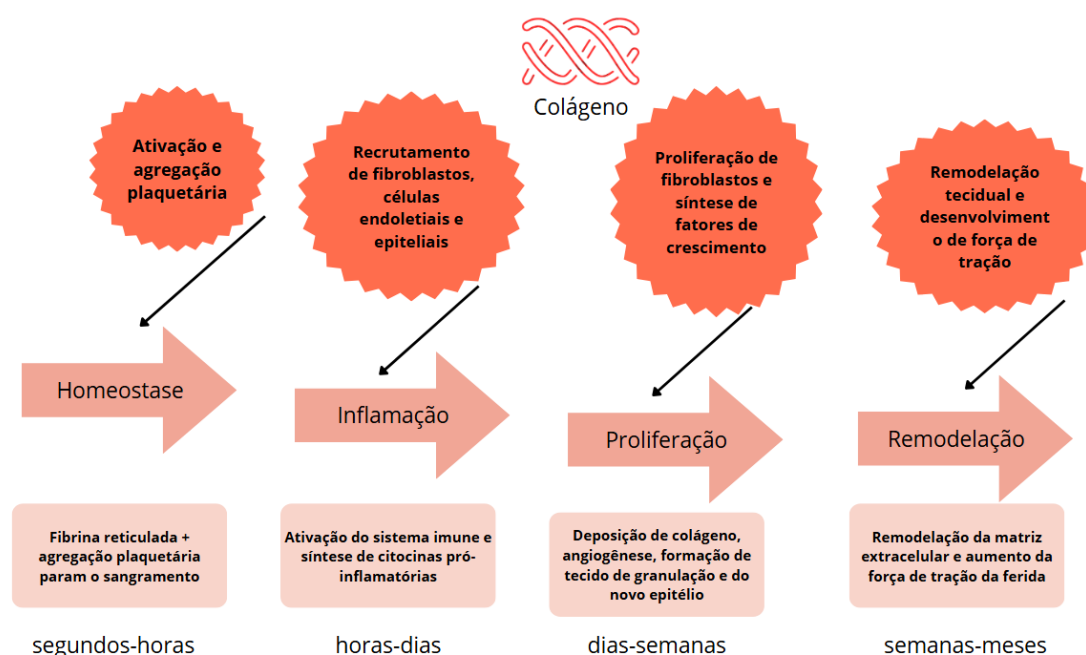
Fonte: Biorender. <https://www.biorender.com/template/collagen-structure>.

As fontes de colágeno mais comuns incluem porcos, bovinos e peixes. O colágeno obtido de peixes possui maior taxa absorção quando comparado aos colágenos de porco e bovinos (Wosicka-Frackowiak *et al.*, 2024).

A obtenção de colágeno envolve processos de pré-tratamento, extração e purificação. A etapa do pré-tratamento envolve deixar a pele em água fria por alguns dias e em seguida cortá-la em pedaços menores. Ácidos diluídos e bases podem ser usados para promover uma hidrólise parcial. O pré-tratamento com ácidos é usado em tecidos frágeis com fibras pouco entrelaçadas enquanto o mesmo processo com base (como NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$) é mais efetivo para extrair colágeno de tecidos mais grossos e resistentes. A fase de extração geralmente envolve um processo de hidrólise química usando ácidos ou bases. Para isso são usados ácidos orgânicos, como ácido acético, cloroacético, cítrico, lático ou ácidos inorgânicos, como ácido sulfúrico e nítrico. O processo extrativo também pode ser realizado por enzimas, como pepsina, triptase e papaína (Menezes *et al.*, 2020; Wosicka-Frackowski *et al.*, 2024)

O colágeno interage com células e regula vias de sinalização extrínsecas e intrínsecas. As vias de sinalização de colágeno contêm os receptores de Integrinas, receptor de domínio de discoidina (DDR), glicoproteína V1 (GPV1), receptor associado a osteoclasto (OSCAR), receptor Imunoglobulina-like associado a leucócitos 1 (LAIR1), receptor manose C tipo 2 (MRC2) (Wang *et al.*, 2025). Figura 12 descreve a atuação do colágeno durante a cicatrização de feridas.

Figura 12 – Atuação do colágeno durante as fases de reparo de feridas.



Fonte: a autora. Adaptado de (Rahman *et al.*, 2024).

O colágeno é uma boa opção de biomaterial para ser usado em aplicações biomédicas por conta de sua hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, excelente biodegradabilidade e baixa imunogenicidade. Entretanto, suas aplicações podem ser limitadas por conta de sua baixa estabilidade térmica (Menezes *et al.*, 2020).

2.2.4 Pele de tilápia e suas aplicações na cicatrização

A pele da Tilápia do Nilo, espécie originária do leste da África, começou a ser aplicada como curativo oclusivo em feridas de queimaduras de segundo grau em 2017 (Lima-Junior *et al.*, 2017) na Universidade Federal do Ceará. Foi constatado que o colágeno presente na pele deste peixe é semelhante ao colágeno encontrado na pele humana (Lima-Junior *et al.*, 2017). Durante a produção de tilápia, apenas 30-40% do peixe é utilizado e o restante gera subprodutos, incluindo a pele que é fonte de colágeno, se mostrando uma alternativa de baixo custo para tratar feridas de pele (Baydogan *et al.*, 2025; Cardoso *et al.*, 2024; Chen; Shen; Xia, 2020; Huang, Jyun-yuan *et al.*, 2024). A tilápia é um dos peixes mais produzidos ao redor do mundo, sendo uma fonte ideal de colágeno por conta de sua disponibilidade (Huang, Jyun-yuan *et al.*, 2024). Em 2020 o Brasil foi o quarto maior produtor de tilápia no mundo, produzindo 0,34 milhões de toneladas (Ng *et al.*, 2024).

Pesquisas ainda continuam a ser desenvolvidas quanto ao uso da pele de tilápia, mas já foi observado que ela é segura aos pacientes (Ghosh *et al.*, 2023). O colágeno de tilápia possui maior estabilidade térmica quando comparado com colágeno de peixes de águas frias e a similaridade entre a sequência de aminoácidos do colágeno de peixe e do colágeno de humanos é de aproximadamente 80% (Huang, Jyun-yuan *et al.*, 2024).

A pele da tilápia do Nilo já foi estudada para ser aplicada em pacientes queimados na forma de enxerto (diretamente sobre a pele), hidrogel e como peptídeos de colágeno isolados. Os estudos *in vivo* utilizando esses materiais mostraram maior redução do tamanho da ferida e em menos tempo quando comparados com grupos controle e estudos clínicos evidenciaram que os pacientes queimados sentiram menos dor ao serem tratados com pele de tilápia do que com o tratamento convencional com pomada de sulfadiazina de prata (Bustaman; Soekmadji; Sanjaya, 2025).

As proteínas da pele de tilápia são responsáveis pelas atividades biológicas e a atividade cicatricial pode ser melhorada quando essas proteínas são hidrolisadas em peptídeos. Os peptídeos são melhor absorvidos por conta de seu menor peso molecular (Wijaya *et al.*, 2023). Peptídeos de colágeno de pele de tilápia possuem efeitos positivos no reparo de tecidos lesados e aceleram o processo de cicatrização ao reduzir a inflamação, promover a proliferação de tecido de granulação, de fibroblastos e de células epiteliais e endoteliais (Cardoso *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2017). Alguns peptídeos identificados do processo de hidrólise da pele da tilápia foram identificados e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Peptídeos identificados no hidrolisado de tilápia usado neste estudo.

Dipeptídeos e tripeptídeos identificados no hidrolisado de tilápia
CT (cisteína-treonina)
GF (glicina-fenilalanina)
D(I/L) (aspartato-isoleucina/leucina)
T(I/L) (treonina-isoleucina/leucina)
(I/L)D (isoleucina/leucina-aspartato)
IH (isoleucina-histidina)
FC (fenilalanina-cisteína)
SY (serina-tirosina)
SGY (serina-glicina-tirosina)
GSY (glicina-serina-tirosina)
EV (glutamato-valina)
MP (metionina-valina)
VE (valina-glutamato)
(I/L) (I/L) (isoleucina-leucina) (isoleucina-leucina)
FP (fenilalanina-prolina)
A(I/L) (alanina-isoleucina/leucina)
S(I/L) (serina-isoleucina/serina)

Fonte: (Tozetto; *et al.*, 2023).

Colágeno e peptídeos da pele de tilápia já foram reportados por possuir atividades antioxidantes, hipoglicêmicas e anti-hipertensivas (Ng *et al.*, 2024; Ren *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2016).

2.2.5 Géis

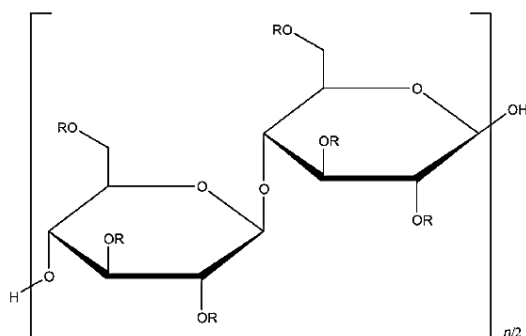
Os géis são formas farmacêuticas definidos como sistemas semissólidos em que um agente gelificante é disperso a um veículo líquido aquoso adquirindo consistência gelatinosa. A essa forma farmacêutica também podem ser adicionados fármacos, solventes, agentes antimicrobianos e agentes estabilizantes, como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) sódico (Jr; Popovich; Ansel, 2013). Eles são sistemas semirrígidos, visto que o movimento da fase dispersa está restrito por uma rede tridimensional entrelaçada de partículas ou macromoléculas solvatadas. Este entrelaçamento é responsável pelo aumento da viscosidade e, conseqüentemente, pelo estado semissólido do gel. Um gel é classificado como monofásico quando não há limite aparente entre as macromoléculas e o líquido dispersante. Os géis são considerados dispersões coloidais, as quais compreendem a dispersão de uma substância sólida (de partículas de dimensões coloidais) dispersa em um meio líquido, sólido ou gasoso. As dispersões coloidais se diferenciam das soluções verdadeiras por serem formadas por partículas opacadas que espalham a luz. A turbidez gerada por dispersões coloidais pode ser observada pelo efeito de Tyndall. Uma partícula possui dimensão coloidal quando seu tamanho varia de 1 nm a 0,5 µm (Jr; Popovich; Ansel, 2013).

Géis e hidrogéis de colágeno constituem um grupo de materiais com potenciais aplicações médicas, as quais incluem tratamento de feridas, engenharia tecidual e sistemas de liberação de fármacos. Suas vantagens incluem a biocompatibilidade, capacidade de mimetizar a matriz extracelular e potencial em promover o reparo tecidual (Wosicka-Frackowiak *et al.*, 2024).

Hidroxietilcelulose (número de registro CAS 9004-62-0) é um polímero não-iônico amplamente usado como agente espessante em formulações farmacêuticas oculares e tópicas, podendo ser encontrado também em cosméticos. Ela é encontrada como um pó higroscópico de coloração branca, branca-amarelada ou branca-acinzentada, inodora e insípida. Este polímero é solúvel em água e sua concentração de uso depende do solvente e de seu peso molecular. Ela é um poli(hidroxietil) éter

de celulose parcialmente substituído e está disponível em diferentes graus que variam em viscosidade e grau de substituição (Figura 13) (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

Figura 13 - Estrutura química do polímero hidroxietilcelulose.



R é H ou $[-CH_2CH_2O-]_mH$ em que m é um número integral dos derivados de celulose. Os graus de hidroxietilcelulose diferem principalmente na viscosidade de suas soluções aquosas que variam de 2-20000 mPa.s para uma solução aquosa a 2% p/v. Exemplos de formas deste polímero disponíveis comercialmente são o Cellulosize HEC®, o Natrosol 250® e Tylose H® (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

O Natrosol 250®, um dos nomes comerciais da hidroxietilcelulose, possui grau de substituição 2,5 e pode ser encontrado em graus de 10 diferentes viscosidades. Esses 10 tipos de Natrosol são identificados pelas siglas HHR, H4R, HR, MHR, MR, KR, GR, ER, JR e LR. As propriedades do Natrosol estão descritas na tabela abaixo (Tabela 4):

Tabela 4 - Propriedades químicas e físicas do polímero hidroxietilcelulose.

Acidez/alcalinidade	pH 5,5-8,5 para uma solução a 1% (p/v)
Teor de cinzas	3,5 % p/p
Densidade aparente	0,60 g/mL
Ponto de fusão	135-140 °C
Ponto de decomposição	280 °C
Teor de umidade a 25 °C	6% p/p em 50% de umidade relativa
Solubilidade	Solúvel em água quente ou gelada; insolúvel em solventes orgânicos; parcialmente solúvel em alguns

	solventes orgânicos polares, como os glicóis.
Densidade de solução aquosa 2% p/v	1,0033

Fonte: (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

Preparações aquosas de hidroxietilcelulose podem ser obtidas em agitação moderada a 20-25 °C até todo o polímero entrar em contato com a água. Após isso, a temperatura deve ser aumentada até 60-70 °C para melhorar a dispersão. As soluções aquosas deste polímero são relativamente estáveis em pH 2-12, entretanto em pH menor que 5,0 tende a hidrólise e em pH alto pode ocorrer oxidação. Sua viscosidade diminui com o aumento da temperatura, mas ela é restaurada quando submetida a resfriamento. A solução pode ser degradada por enzimas produzidas por microrganismos, portanto é indispensável a adição de conservantes para armazenamento prolongado (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

2.2.6 Estudo de estabilidade e desenvolvimento de formulação

A validade de um produto farmacêutico está diretamente relacionada a sua estabilidade. A estabilidade é definida como a habilidade de um produto manter as suas características e qualidades em todos os aspectos desde a sua produção e envase até o final de seu armazenamento ou final da validade. Diversos fatores influenciam a estabilidade de produtos farmacêuticos, sendo alguns deles a umidade, temperatura, o pH, a presença de oxigênio e a exposição à luz (Akash; Rehman, 2020).

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser dividida em cinco classes sendo elas a) estabilidade física; b) estabilidade química; c) estabilidade microbiológica; d) estabilidade terapêutica e e) estabilidade toxicológica. A primeira se refere à capacidade do produto manter suas características físicas, como aparência, homogeneidade de fases, presença de sedimentos, textura, transparência. A estabilidade química está relacionada à preservação as características químicas dos componentes ativos. A instabilidade química pode ocorrer devido às reações de hidrólise, oxirredução e fotólise. A instabilidade microbiológica ocorre pelo crescimento de microrganismos devido à presença de umidade o que pode levar à degradação dos produtos e do insumo farmacêutico ativo (Akash; Rehman, 2020).

As alterações de estabilidade podem ser de origem extrínsecas, quando causadas por fatores externos, ou de origem intrínsecas, quando causadas por fatores inerentes à formulação. Podem ser classificados como fatores externos (de origem extrínseca) o tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, presença de microrganismos e vibração durante o transporte que pode acarretar na separação de fases. Os fatores intrínsecos podem ser incompatibilidade física e incompatibilidade química (ANVISA, 2004).

Os testes de estabilidade precisam ser realizados durante o desenvolvimento de novas formulações e eles devem ser conduzidos em condições que acelerem as mudanças que podem ocorrer durante o prazo de validade. As condições de armazenamento podem ser em temperatura ambiente, em temperatura elevada (estufa) ou em temperatura baixa (geladeira e freezer) (ANVISA, 2004).

O Teste de Estabilidade Acelerada (ou Estabilidade Normal ou Exploratória) ocorre na fase inicial do desenvolvimento do produto e tem duração reduzida. Este teste emprega condições extremas de temperatura para acelerar possíveis reações entre os componentes e aparecimento de sinais de instabilidade. Este é um estudo que pode estimar o prazo de validade de um produto. Geralmente possui duração de 90 dias, mas em alguns casos pode ser estendido para seis meses ou até um ano. De forma geral, devem ser avaliadas as a) características organolépticas: aspecto, cor, odor e sabor, quando aplicável; b) características físico-químicas: valor de pH, viscosidade e densidade, entre outros; c) características microbiológicas: estudo do sistema conservante do produto por meio do teste de desafio efetuado antes e ou após o período de estudo acelerado (ANVISA, 2004; Leonardi; Spers, 2015).

2.2.7 Conservantes antimicrobianos em formulações tópicas

A propagação de bactérias, fungos e leveduras em produtos tópicos depende de fatores físico-químicos, como a disponibilidade de água, a temperatura do armazenamento, a composição do produto, entre outros. O produto é um substrato com substâncias que podem favorecer o crescimento microbiano, o qual pode causar alterações na qualidade do produto, tais como alteração de cor, odor, viscosidade, além da produção de componentes tóxicos ao usuário. A deterioração microbiana deve ser controlada, especialmente se o produto for utilizado em casos em que há dano do tecido epitelial, como é o caso das queimaduras e feridas abertas. Algumas

matérias-primas podem potencializar os efeitos do sistema conservante, como é o caso de álcoois, polióis (como a glicerina em concentração acima de 3%) e antioxidantes, como o metabissulfito de sódio (Leonardi; Spers, 2015).

Segundo a RDC 528/2021, conservantes são substâncias que possuem a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos durante sua fabricação e estocagem ou proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso.

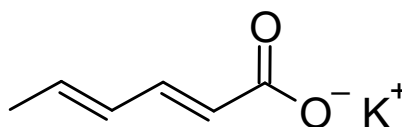
O sistema conservante ideal deve ser efetivo em baixas concentrações e contra um amplo espectro de microrganismos, deve ser solúvel na formulação na concentração efetiva, deve ser atóxico e não sensibilizante, precisa ser compatível com os outros componentes da formulação e da embalagem, precisa ser estável em ampla faixa de pH e temperatura e deve ser estável a hidrólise (Leonardi; Spers, 2015).

Os conservantes podem ser classificados quanto a sua natureza química em: a) fenol e derivados, b) álcoois alifáticos e aromáticos, c) compostos orgânicos mercuriais, d) agentes tensoativos catiônicos, e) derivados de ácidos carboxílicos (Leonardi; Spers, 2015).

2.2.7.1 Sorbato de potássio

O Sorbato de potássio ($C_6H_7O_2K$) (Figura 14) é um conservante antimicrobiano usado nas concentrações de 0,1-0,2% com propriedades antibacterianas e antifúngicas, porém com atividade antibacteriana limitada em pH acima de 6,0, sendo predominantemente usado pelas suas ações antifúngicas. Ele é preparado com ácido sórbico e hidróxido de potássio. Sua ação antimicrobiana é menor do que a do ácido sórbico, entretanto possui maior solubilidade em água, facilitando sua adição em preparações aquosas (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009; pg 579).

Figura 14 – Estrutura química do sorbato de potássio.

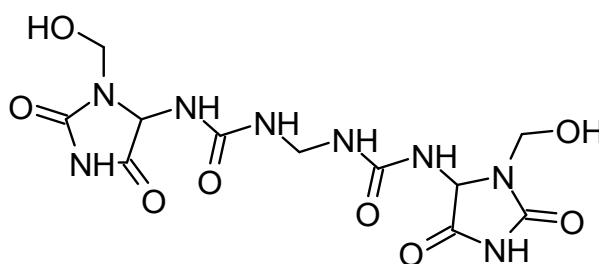


Fonte: a autora.

2.2.7.2 Imidazolidinil ureia

A imidazolidinil ureia (número de registro CAS 39236-46-9) (Figura 15) é um conservante antimicrobiano de amplo espectro (especialmente quando combinada com parabenos) usado em formulações cosméticas e farmacêuticas nas concentrações que variam de 0,03-0,6% p/p. Ela é efetiva na faixa de pH 3-9. Ela é um pó branco higroscópico obtida da condensação da alantoína com formaldeído (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009). A RDC 528/2021 permite o seu uso na concentração de até 0,6%. Ela deve ser adicionada nas formulações em temperatura inferior a 50 °C e é incompatível com Buthyl methoxydibenzoylmethane (BMDM) (Leonardi; Spers, 2015).

Figura 15 – Estrutura química da imidazolidinil ureia.



Fonte: a autora.

2.2.7.3 Metabissulfito de sódio

O metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) é um antioxidante usado em formulações orais, parenterais e tópicas nas concentrações 0,01-1% p/v. Ele se apresenta como um pó cristalino de coloração branca a creme e é solúvel em água (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

2.2.7.4 Metilparabeno

O metilparabeno é um conservante antimicrobiano amplamente usado em formulações cosméticas, em alimentos e em produtos farmacêuticos. Ele pode ser usado sozinho ou em combinação com outros conservantes. Ele é efetivo em uma ampla faixa de pH (pH 4-8) e possui uma atividade antimicrobiana de amplo espectro.

Em preparações tópicas é usado na faixa de concentração de 0,02-0,3% (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a estabilidade acelerada de hidrogéis contendo peptídeo hidrolisado de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e realizar estudos clínicos em animais de companhia (cães e gatos) quanto à cicatrização de feridas.

2.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver formulações de gel de hidroxietilcelulose como veículo para incorporação do peptídeo hidrolisado de tilápia;
- Estudar os seguintes parâmetros para avaliação da estabilidade acelerada (a 40°C e 75% de umidade relativa) de hidrogel contendo peptídeos hidrolisados de tilápia: parâmetros organolépticos, viscosidade, espalhabilidade, densidade e pH, teor de ativo e produtos de degradação;
- Avaliar o potencial cicatricial do hidrogel frente a feridas de primeira intenção em pacientes caninos;
- Avaliar o potencial cicatricial do hidrogel em feridas de segunda intenção em cachorros e gatos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Desenvolvimento da formulação de hidrogel contendo PHT

Foram desenvolvidas três formulações de hidrogel usando o polímero hidroxietilcelulose (Natrosol®) como agente de viscosidade. Os conservantes foram escolhidos de acordo com a lista de conservantes permitidos para uso em produtos

de higiene pessoal, cosméticos e perfumes preconizados pela RDC Nº 528/2021 (ANVISA, 2021).

A base do hidrogel da F1 foi composta por hidroxietilcelulose (HEC) 2,5% (p/p), metilparabeno 0,2% (p/p), imidazolidinil ureia 0,1% (p/p) e água destilada qsp 100 g. O conservante antimicrobiano metilparabeno foi dissolvido em q.s de água destilada aquecida a 70 °C. Em seguida, a HEC foi adicionada sob agitação constante na mesma temperatura e, após a sua solubilização e redução da temperatura do sistema até 50 °C, foi adicionado o conservante imidazolidinil ureia.

A amostra F1 contendo PHT (denominada HEC-PHT) foi dividida em três bisnagas plásticas e opaca (triplicata) e o controle negativo (denominada de HEC) em duas bisnagas do mesmo material (duplicata). Ainda, ambas as amostras foram separadas para a avaliação em tempo zero (inicial), trinta, sessenta e noventa dias. Posteriormente, as amostras correspondentes a trinta, sessenta e noventa dias foram acondicionadas em câmara de aquecimento (estufa) para o início do estudo de estabilidade acelerada.

A formulação F2 foi composta de HEC 2,5% (p/p) (hidroxietilcelulose- Natrosol® 250 HHR, Inlab, Lote: 873771) sorbato de potássio 0,15% (p/p (ACS Científica, Lote 202509670), imidazolidinil ureia 0,2% (ACS Científica, Lote 202509643), Metabissulfito de sódio 0,1%, EDTA 0,1% (ACS Científica, Lote 202407430) e água qsp 100 g. Para a preparação, todos os pós foram solubilizados e levados para aquecimento até 40 °C e deixados em agitação por 30 minutos. Em seguida, o PHT foi adicionado na concentração de 1mg/mL. As amostras, tanto branco (HEC), quanto contendo PHT (HEC-PHT) foram armazenadas em frascos de vidro e acondicionadas em estufa até os dias das análises de tempo 30, tempo 60 e tempo 90.

Após a avaliação do tempo 30 de F2, foram observadas algumas mudanças nas características do produto e assim, foram propostas outras formulações deste hidrogel com concentrações diferentes de hidroxietilcelulose. Dessa forma, foram preparados géis contendo 0,8%, 1%, 1,25% e 1,5% de HEC.

Para otimizar a formulação foi adicionada glicerina na concentração de 3% chegando à formulação F3. A Tabela 5 mostra a diferença entre as formulações F1, F2 e F3:

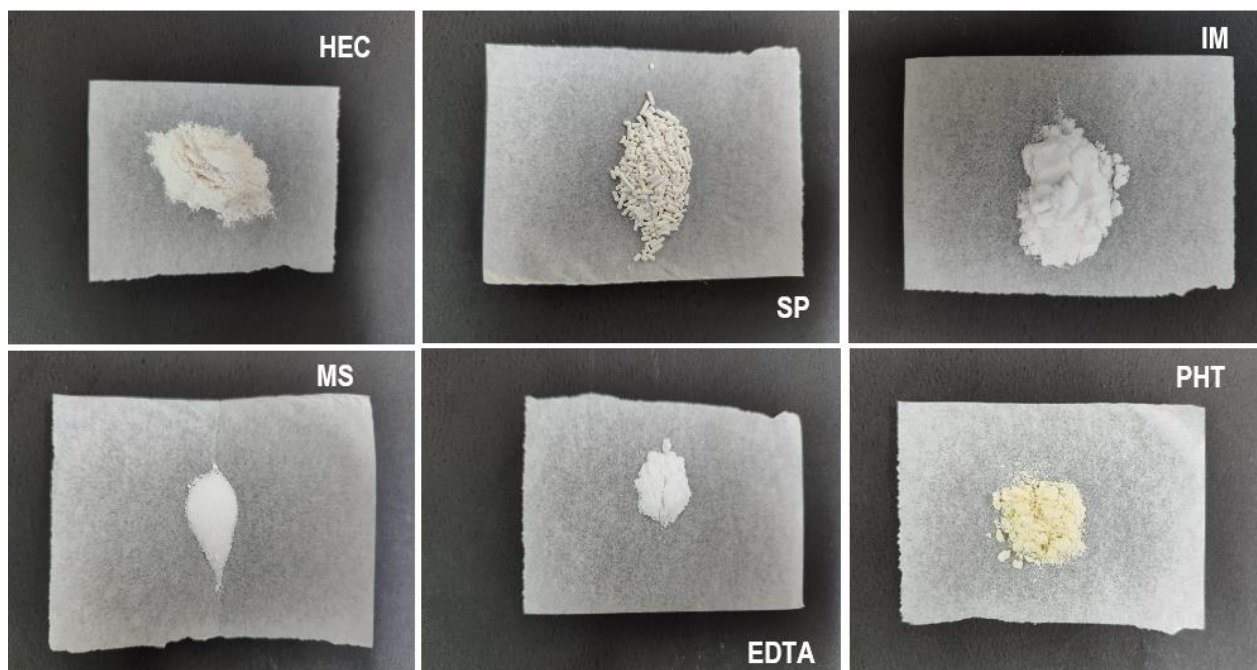
Tabela 5 – Matérias-primas e suas concentrações adicionadas às formulações F1, F2 e F3.

Matéria-prima	Concentração			Função
	F1	F2	F3	
Peptídeo de tilápia (PHT)	1mg/g	1mg/g	1mg/g	ativo
Hidroxietilcelulose (similar ao Natrosol 250 HHR)	2,5%	2,5%	1,5%	Polímero (gel)
Glicerina	---	---	3%	umectante
Metilparabeno	0,2%	---	---	Conservante de amplo espectro
Sorbato de potássio	---	0,15%	0,2%	Conservante microbiostático
Imidazolidinil ureia	0,1%	0,2%	0,2%	Conservante antibacteriano
Metabissulfito de sódio	---	0,1%	0,1%	Antioxidante
EDTA	---	0,1%	0,1%	quelante
Água	Qsp 100 g			solvente

As formulações identificadas como brancas (HEC) foram preparadas com as mesmas matérias-primas, com exceção do peptídeo hidrolisado de tilápia (PHT). Fonte: a autora.

Para o preparo do hidrogel F3, primeiro foi pesada a hidroxietilcelulose e a glicerina. Estas foram homogeneizadas até a formação de uma pasta. Em seguida foi pesada a água e a pasta foi homogeneizada até completa solubilização. Essa solução foi levada para aquecimento e agitação até chegar na temperatura de 70 °C. A solução foi deixada em agitação nesta temperatura por 30 minutos. Em seguida, ela foi deixada para resfriamento, com homogeneização a cada 5 minutos para evitar a formação de grumos de polímero. Os conservantes foram adicionados a 40 °C e o PHT foi previamente solubilizado em água destilada. Após adicionado o PHT, o hidrogel foi homogeneizado e em seguida embalados em bisnagas de alumínio de 100 g. Foram separadas amostras para serem armazenadas em estufa por 180 dias, as quais foram denominadas F3E, e amostras para serem armazenadas em temperatura ambiente por 180 dias. As matérias-primas usadas para a fabricação dos hidrogéis F2 e F3 estão mostradas na Figura 16:

Figura 16 – Matérias-primas usadas na fabricação do hidrogel.



HEC- hidroxietilcelulose; SP- sorbato de potássio; IM- imidazolidinilureia; MS- metabissulfito de sódio; EDTA- ácido etilenodiamino tetracético dissódico; PHT- peptídeo hidrolisado de tilápia. Fonte: a autora.

2.3.2 Avaliação da estabilidade acelerada

O teste de estabilidade acelerada ocorreu de acordo com o previsto na Instrução Normativa 15/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2005) o qual é um “Regulamento Técnico que visa definir os critérios para a realização de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos veterinários, a fim de prever, determinar e monitorar o prazo de validade dos produtos”.

Esta IN informa que para a concessão de prazo de validade provisório, deverá ser apresentado teste de estabilidade acelerada, conduzido em câmara climatizada (estufa) a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ de UR (umidade relativa), por um período de 6 (seis) meses (180 dias). Estas condições de armazenamento foram usadas para a condução do estudo de estabilidade dos hidrogéis contendo peptídeos hidrolisados de tilápia. Também foram avaliados hidrogéis armazenados em temperatura ambiente.

A estufa foi previamente qualificada para as condições de temperatura e umidade preconizadas pela IN 15/2005 (MAPA) e pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 318, de 6 de novembro de 2019 (Anvisa, 2019), em $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

e $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, através da verificação destes parâmetros durante 24 horas, com registro a cada duas horas.

As formulações foram submetidas previamente ao teste de centrifugação conforme recomendado pelo Guia de Estabilidade de Produto Cosméticos (ANVISA, 2024). Foram utilizados 5 g de cada amostra, dispostas em tubos para centrífuga e submetidas à centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos. Após observar que os produtos se mantiveram estáveis, eles foram submetidos ao teste de estabilidade acelerada. Caso houvesse sinais de instabilidade as formulações precisariam ser reformuladas (ANVISA, 2024).

Os parâmetros avaliados por este teste foram: características organolépticas (cor, odor, presença de sedimento, turvação e separação de fases); densidade; viscosidade; espalhabilidade; pH; teor de ativo e produtos de degradação e teste de eficiência do sistema conservante.

2.3.2.1 Avaliação das características organolépticas

Foram avaliadas visualmente as características macroscópicas das formulações quanto à cor, odor, presença de sedimento, turvação e separação de fases. O odor foi avaliado pelo olfato e os demais parâmetros foram avaliados por meio de fotografias. Para isso, foram registradas fotos dos produtos em frascos de vidro contendo quantidades padronizadas das formulações testadas. Os géis foram comparados em relação ao Padrão, os quais foram obtidos logo após o término da manipulação (T0). Assim, foram avaliadas mudanças nas características em cada tempo em relação a T0. Os parâmetros foram avaliados como: N = normal, sem alterações; LA = levemente alterado; IM = intensamente alterado (Mariotti, Frasson, 2011).

2.3.2.2 Densidade aparente

A densidade aparente foi determinada com o auxílio de provetas de 10 mL. Essas foram taradas e em seguida foram adicionados aproximadamente 2,0 mL de amostra de gel. As provetas foram então pesadas com a amostra. A densidade aparente foi definida de acordo com o seguinte cálculo:

$$\text{Densidade aparente} = \frac{(\text{massa proveta com amostra} - \text{massa proveta vazia})}{\text{volume da amostra}}$$

2.3.2.3 Avaliação da viscosidade

O fluxo dos hidrogéis das formulações F1 foi determinada através do reômetro em modo contínuo (TA® modelo Discovery Hybrid Rheometer 2). A geometria utilizada foi a cone-placa (permitindo normalizar a taxas de cisalhamento em toda a amostra e uma determinação precisa de sua viscosidade real), com as configurações: 40 mm de diâmetro, ângulo de inclinação do cone de 2,006° e “gap” (lacuna) de 57 µm. A calibração do equipamento foi feita com o software TRIOS® versão 5.1.1.46572, estabelecendo-se as condições: temperatura 25 °C, tensão constante de 1% (taxa de estresse), e taxa de cisalhamento de 0,1 a 100 s⁻¹. Foram utilizados cerca de 1,5 mL de cada amostra para a análise. Elas foram aplicadas no centro da placa inferior *peltier plate*, com auxílio de uma seringa. O *trim gap* foi utilizado para remoção dos excessos em torno da placa, e em seguida “zero gap” para início da análise. Os dados obtidos foram processados no Software GraphPad Prism® para construção dos gráficos da taxa de cisalhamento *versus* viscosidade.

A viscosidade das formulações F2, F3E e F3A foi determinada por Viscosímetro digital rotativo Quimis®. Foi selecionado o spindle de número 4 e as amostra foram analisadas nas rotações de 6 rpm, 12 rpm, 30 rpm e 60 rpm por um minuto em cada rotação ou até que o valor da viscosidade se estabilizasse. Para análise dos resultados, foram construídos gráficos de rpm *versus* viscosidade (Pa.s) no GraphPad Prism®.

2.3.2.4 Estudo da espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada por uma adaptação do método das placas paralelas (Bakhrushina *et al.*, 2021). Para isso, foi utilizado um papel milimetrado para aferição dos diâmetros e uso de lâminas de microscopia transparentes. Em uma lâmina foi pesado 50 mg de amostra de hidrogel, a qual foi colocada sobre o papel milimetrado. Em sequência, foram feitas quatro medições do diâmetro do hidrogel após serem colocadas outras lâminas acima da amostra, uma acima da outra até que quatro delas estivessem sobre a amostra. O diâmetro foi marcado após um minuto que cada lâmina foi colocada e assim pode ser observada o quanto que o hidrogel se

espalhou. Em cada teste de espalhabilidade foram utilizadas as mesmas lâminas, as quais foram anotados os seus pesos sendo lâmina 1= 4,7169 g; lâmina 2= 5,1405 g; lâmina 3= 4,6914 g e lâmina 4= 4,7461 g. Assim, foi possível a construção de gráficos de espalhabilidade da Espalhabilidade (mm^2) *versus* pesos.

Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, sendo calculado por meio da equação:

$$Ei = (d^2 \times \pi) \div 4$$

Em que:

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

d = diâmetro médio (mm) (Giarola, 2015).

2.3.2.5 *Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)*

O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido usando aparelho pHmetro digital Phox P1000. O aparelho foi calibrado usando soluções tampão de pH 6,86, pH 4,00 e pH 9,18. Após a calibração, o eletrodo foi higienizado com água destilada para aferição do pH das amostras de hidrogel, as quais foram diluídas a 10% (m/v) em água destilada.

2.3.3 Estudo clínico

2.3.3.1 *Avaliação da cicatrização em feridas por primeira intenção*

Foram avaliados 40 cachorros submetidos a processo cirúrgico de castração. Em 20 deles foi administrado o hidrogel contendo o ativo (Grupo Tratamento) e em 20 o hidrogel base sem o ativo (Grupo Controle). Os hidrogéis foram administrados diariamente durante 7 dias após a cirurgia. Os parâmetros avaliados estão contidos na ficha de avaliação do Anexo 1. O experimento foi aprovado pela CEUA pelo processo N° 23000064623-1.

2.3.3.2 *Avaliação da cicatrização em feridas por segunda intenção*

Foram avaliados cachorros e gatos com feridas abertas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da UEPG sob o processo N° 25000063499-8. Foram

selecionados 6 animais para o Grupo Tratamento (aos quais foi administrado o hidrogel com ativo – HEC-PHT) e 4 animais para o Grupo Controle (aos quais foi administrado o produto comercial cicatrizante Regepil® a base de tartarato de ketanserina e asiaticosídeo). Tanto o hidrogel quanto o Regepil foram administrados 2 vezes ao dia em quantidade suficiente para cobrir toda a área da ferida. Antes da aplicação do produto, as feridas foram lavadas com soro fisiológico. Dentre os animais utilizados neste estudo, 6 foram resgatados abandonados ou em situações de maus-tratos. As feridas foram fotografadas diariamente com auxílio de gabarito para padronização. A retração da ferida foi avaliada por software ImageJ através da fórmula abaixo do Índice de Retração (IR). O tratamento foi realizado durante 35 dias ou até o fechamento total da ferida. A avaliação dos animais foi realizada semanalmente por profissional veterinário.

$$IR = \frac{(Ai - Af) \times 100}{Ai}$$

Sendo,

Ai- Área da ferida inicial (referente ao dia 0);

Af- Área da ferida final (referentes aos dias 7, 14, 21, 28 e 35).

2.3.4 Análise estatística

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism através dos testes estatísticos ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey. Para a análise dos hidrogéis, foram analisados os grupos tempo e os grupos HEC *versus* HEC-PHT.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Estudo de estabilidade acelerada de hidrogéis F1 e F2

2.4.1.1 Avaliação das características organolépticas

Formulações de hidrogéis com peptídeos de pele de tilápia mimetizam a barreira de proteção natural da pele, prevenindo infecções bacterianas enquanto reduz a inflamação (Bustaman; Soekmadji; Sanjaya, 2025). Dessa forma, é interessante o desenvolvimento de diferentes formulações de hidrogéis com peptídeos

hidrolisados de tilápia para aplicação tópica em feridas. Neste trabalho, foram desenvolvidas três formulações de hidrogel com PHT as quais foram denominadas F1, F2 e F3.

A hidroxietilcelulose, polímero usado para espessar os hidrogéis das formulações deste estudo, é um derivado semissintético da celulose com propriedades não-iônicas e solúvel em água. Este polímero é muito usado em formulações dermatológicas por conta de sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade em água e por não possuir toxicidade (Risaliti *et al.*, 2021).

As formulações de hidrogel F1 não apresentaram mudanças organolépticas durante o tempo de 90 dias em que o estudo de estabilidade foi conduzido (Tabela 6). Apenas o hidrogel contendo PHT apresentou uma leve alteração de cor no Tempo 90, conforme mostrado na Figura 17.

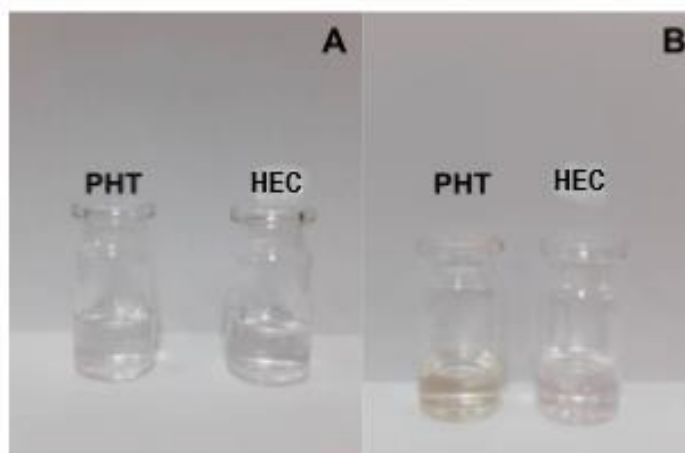
Tabela 6 – Características organolépticas do hidrogel F1.

PARÂMETROS

TEMPO	COR		ODOR		TURBIDEZ		SEDIMENTAÇÃO	
	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC
TEMPO 0	N	N	N	N	N	N	N	N
TEMPO 30	N	N	N	N	N	N	N	N
TEMPO 60	N	N	N	N	N	N	N	N
TEMPO 90	LA	N	N	N	N	N	N	N

LA- levemente alterado; N- normal. Fonte: a autora.

Figura 17 - Hidrogéis F1 no A) tempo 0 e B) no tempo 90. PHT- hidrogel com peptídeo hidrolisado de tilápia; HEC- hidrogel sem peptídeo (branco).



Fonte: a autora.

Os hidrogéis F2 foram desenvolvidos com a mesma concentração de HEC que a formulação F1, mas com as demais matérias-primas diferentes, sendo elas sorbato de potássio 0,15%, imidazolidinilureia 0,2%, metabissulfito de sódio 0,1% e EDTA 0,1%. A formulação F2 apresentou alterações de coloração já a partir do dia 30 em estufa e ao final do estudo de 90 dias, a coloração havia se alterado intensamente (Tabela 7 e Figura 18).

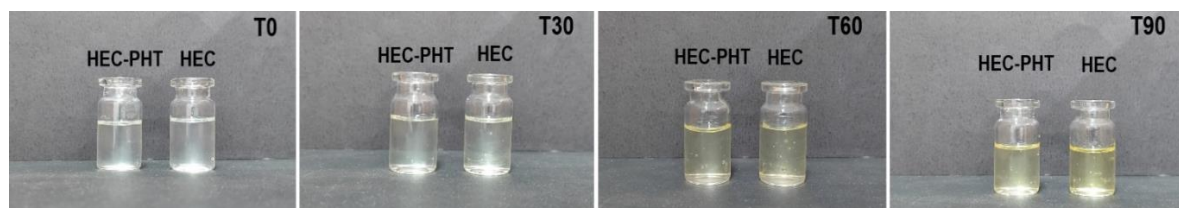
Tabela 7 - Características organolépticas do hidrogel F2.

PARÂMETROS

TEMPO	COR		ODOR		TURBIDEZ		SEDIMENTAÇÃO	
	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC
TEMPO 0	N	N	N	N	N	N	N	N
TEMPO 30	LA	LA	N	N	N	N	N	N
TEMPO 60	IM	IM	N	N	N	N	N	N
TEMPO 90	IM	IM	N	N	N	N	N	N

IM- Intensamente alterado; LA- levemente alterado; N- normal. Fonte: a autora.

Figura 18 - Características dos hidrogéis F2 nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco).

Fonte: a autora.

Uma possível explicação para a alteração de coloração desta formulação é que a imidazolidinil ureia pode ter sido acrescentada antes do resfriamento, o que pode tê-la degradado, visto que a temperatura ideal para acrescentar esse conservante é inferior a 50 °C (Leonardi; Spers, 2015).

2.4.1.2 Avaliação do pH das formulações F1 e F2

A estabilidade de compostos farmacêuticos é um fator crítico para garantir sua eficácia, segurança e prazo de validade. Um dos principais fatores que influenciam essa estabilidade é o pH do ambiente em que esses compostos são armazenados e administrados. Variações de pH podem levar à degradação significativa de compostos farmacêuticos, reduzindo sua eficácia terapêutica e potencialmente resultando na formação de subprodutos nocivos. Por exemplo, condições ácidas ou básicas podem acelerar a hidrólise, a oxidação e outras vias de degradação, impactando tanto a integridade química quanto a atividade farmacológica dos medicamentos (Vardan, 2024).

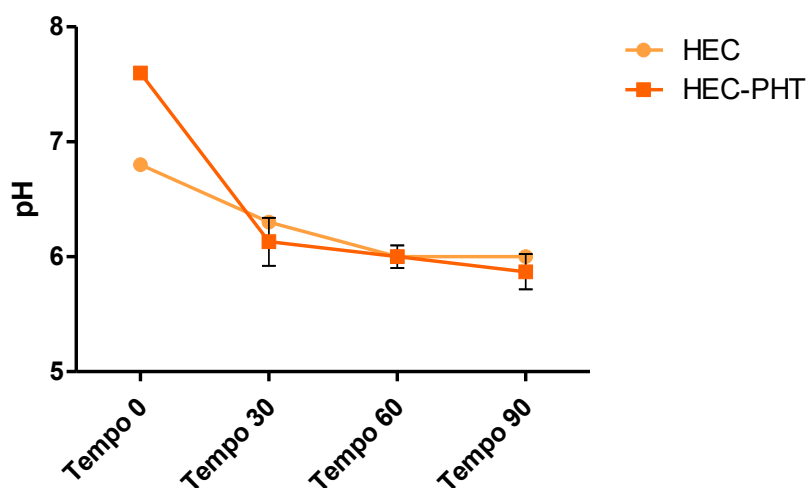
Compreender e controlar os níveis de pH é crucial na formulação e no armazenamento de produtos farmacêuticos para minimizar a degradação e maximizar a estabilidade do medicamento. Condições de pH neutro são frequentemente ideais para a estabilidade de muitos produtos farmacêuticos (Vardan, 2024).

O pH é um parâmetro crítico na avaliação da qualidade de géis, já que impacta na efetividade e segurança do insumo farmacêutico ativo, bem como no conforto o paciente durante a administração (Wang *et al.*, 2025). O pH desempenha papel importante na solubilidade do princípio ativo e, conseqüentemente, na sua biodisponibilidade (Tembhare; Gupta; Umekar, 2019). Assim, o pH ideal de uma

formulação é aquela em que o ativo está mais solúvel. O nível de pH, uma medida da concentração de íons de hidrogênio em uma solução, desempenha um papel crítico na estabilidade de compostos farmacêuticos. Os compostos exibem graus variáveis de estabilidade, dependendo se estão em ambientes ácidos ($\text{pH} < 7$), neutros ($\text{pH} = 7$) ou básicos ($\text{pH} > 7$) (Vardan, 2024).

A avaliação pH dos hidrogéis F1 mostrou que houve redução dos valores durante o tempo de análise, principalmente entre os Tempos 0 e 30. Foi possível observar maior alteração no hidrogel contendo o ativo PHT, sugerindo que os peptídeos podem ser os responsáveis por essa alteração. Os valores de pH de F1 estão mostrados na Figura 19:

Figura 19 - pH dos hidrogéis F1.

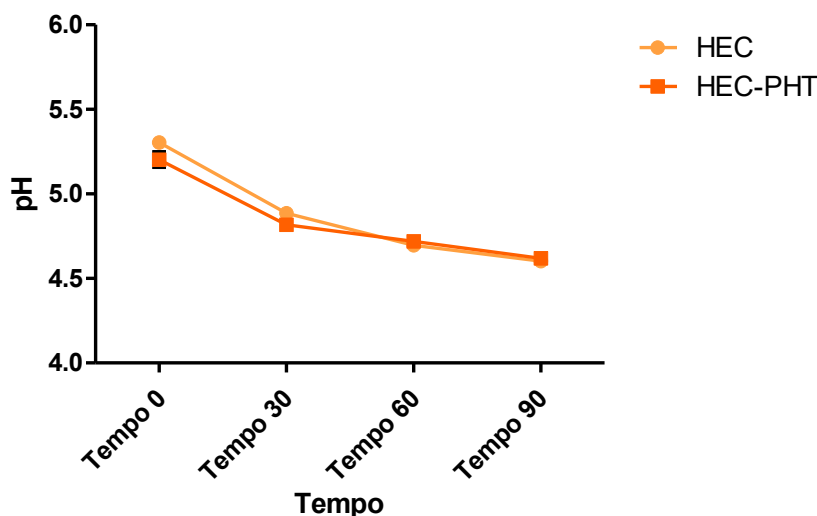


HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). ANOVA com teste de Tukey; $p > 0,05$. Fonte: a autora.

O pH inicial de HEC-PHT de F1 acima de 7,5 é um pH maior do que possui a maioria dos produtos tópicos (Indah; Rahmani; Zulkarnain, 2023). A abrupta diminuição deste pH no dia 30, um pH mais comum em géis, pode indicar instabilidade ou degradação de algum componente.

Apesar da alteração da coloração da formulação F2 conforme mostrado no subitem 2.4.1.1 tanto no hidrogel branco HEC e no hidrogel HEC-PHT, a alteração de pH não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos conforme mostra a Figura 20.

Figura 20 - pH dos hidrogéis F2.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos HEC e HEC-PHT. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

O pH do ambiente da ferida, é um fator que influencia o tratamento. Em condições saudáveis, a pele humana possui um pH que varia de 4-6. Entretanto, quando uma ferida se instala esse pH pode se alterar, geralmente aumentando. Em queimaduras o pH da pele pode chegar a 8,5 por conta do acúmulo de exsudato e da presença de bactérias (Tudoroiu *et al.*, 2025).

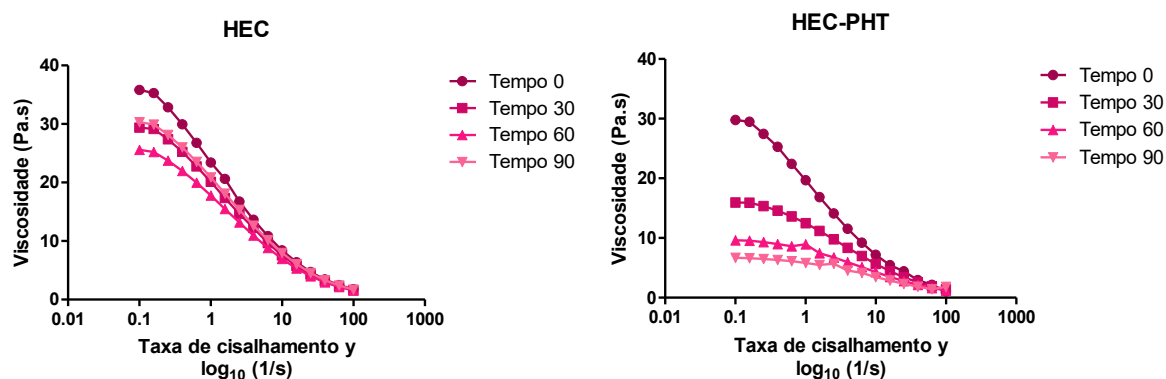
Um estudo avaliou a variação do pH da pele de cães e encontrou valores que variaram de 4,40-8,18, uma faixa mais alcalina que o pH da pele humana (Schlake *et al.*, 2021).

2.4.1.3 Avaliação das características reológicas dos hidrogéis F1 e F2

As análises das características reológicas do hidrogel F1 em reômetro mostrou que a viscosidade diminui conforme aumenta a taxa de cisalhamento. Houve maior alteração nos valores de viscosidade nos hidrogéis contendo PHT do que no hidrogel sem o ativo. A viscosidade diminuiu conforme aumentou o tempo de armazenamento na estufa. Conforme mostram os gráficos das figuras abaixo, a viscosidade do branco HEC diminuiu de 35,81 Pa.s para 30,30 Pa.s enquanto a viscosidade do hidrogel HEC-PHT diminuiu de 29,79 Pa.s para 6,69 Pa.s (Figura 21). Já está descrito na literatura que a viscosidade dos hidrogéis à base de hidroxietilcelulose varia dependendo da

taxa de cisalhamento e da temperatura, apresentando um comportamento pseudoplástico dos hidrogéis (Risaliti *et al.*, 2021)

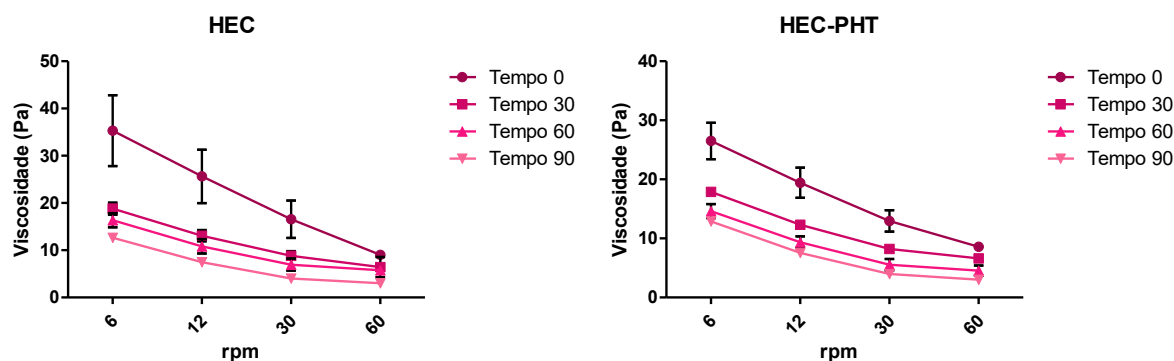
Figura 21 - Viscosidade por reômetro dos hidrogéis F1.



HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60 e 90. ANOVA com teste de Tukey. HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; Valor de $p < 0,05$ para os Tempo 0 vs 60 e para os Tempos 0 vs 90. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

A avaliação da viscosidade dos hidrogéis F2 (Figura 22) por viscosímetro digital mostrou uma redução do parâmetro, porém que não foi estatisticamente significativa.

Figura 22 - Viscosidade dos hidrogéis F2.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60 e 90. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

A diminuição constante da viscosidade indicou uma perda contínua de emaranhamento do polímero com o aumento da taxa de cisalhamento, com comportamento pseudoplástico. A pseudoplasticidade é uma propriedade desejável de formas farmacêuticas semissólidas, uma vez que devem ser "finas" durante a

aplicação e "espessas" fora dela. Esse comportamento pseudoplástico pode ser atribuído ao arranjo instantâneo da estrutura da rede de hidrogel em camadas que podem fluir na direção do cisalhamento e, como consequência, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (Risaliti *et al.*, 2021).

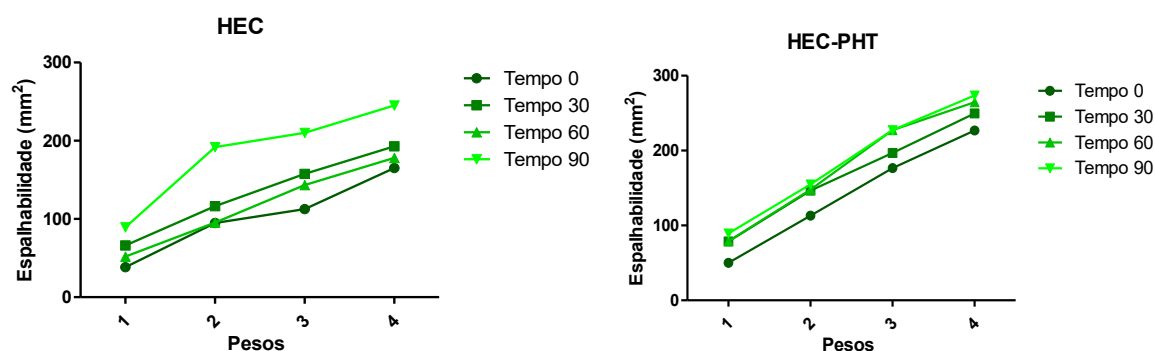
2.4.1.4 Avaliação da espalhabilidade dos hidrogéis F1 e F2

A eficácia do tratamento de um hidrogel depende de o paciente espalhar a formulação em uma camada uniforme sobre a pele para que o medicamento atue de forma igual em toda a área a ser tratada. Por conta disso, a espalhabilidade de formas semissólidas é um dos parâmetros mais importantes a serem mensurados. A espalhabilidade determina a administração da dose necessária do medicamento no local de uso, facilidade de aplicação e extrudabilidade da embalagem primária (Bakhrushina *et al.*, 2021).

O estudo de espalhabilidade pode revelar a resistência (firmeza), a aderência da formulação no local de aplicação e a força de extrusão, exibindo a flutuação da força em função do tempo (trabalho de adesão) (Çaglar *et al.*, 2023).

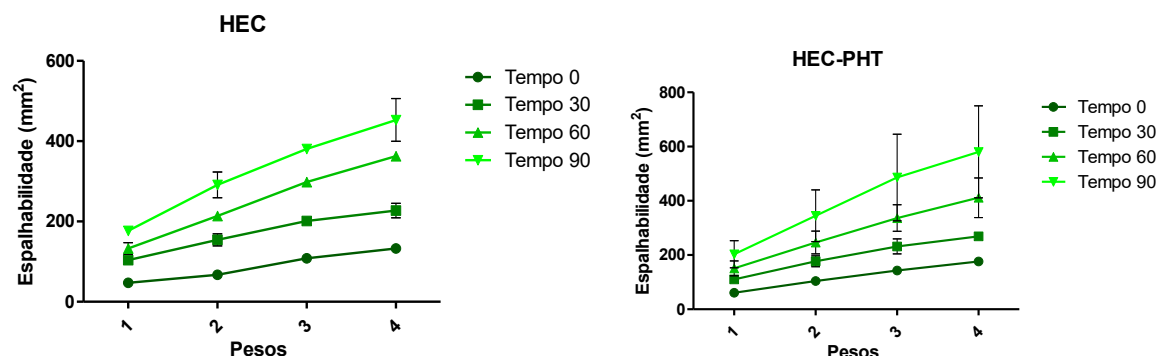
Na avaliação da espalhabilidade da formulação F1 (Figura 23) não houve alteração desse parâmetro durante os 90 dias de estudo. Já para a formulação F2, houve mudança no Tempo 90 em relação ao Tempo 0 (Figura 24).

Figura 23 - Espalhabilidade dos hidrogéis F1.



HEC: hidrogel sem peptídeo (branco); HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia. Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60 e 90. Fonte: a autora.

Figura 24 - Espalhabilidade dos hidrogéis F2.

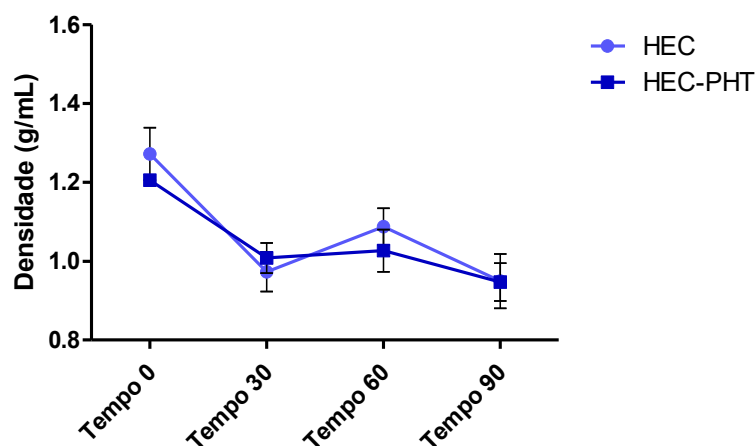


HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p < 0,05$ para os grupos Tempo 0 vs Tempo 90 para ambos os géis. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

2.4.1.5 Avaliação da densidade dos hidrogéis F1, F2 e F3.

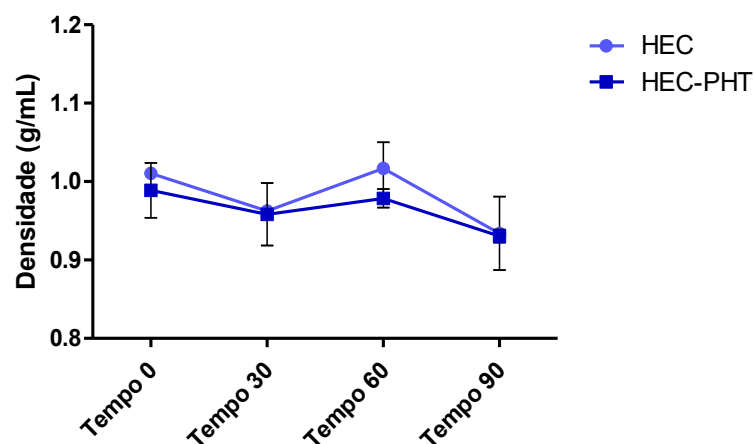
O parâmetro da densidade pode indicar a presença de ar (bolhas) na formulação e a evaporação de produtos voláteis (Brasil, 2004). A densidade não é um parâmetro obrigatório, mas pode ser complementar às outras avaliações. Em temperatura elevada, como o caso destes hidrogéis armazenados em estufa, as moléculas podem se afastar umas das outras por conta da energia térmica o que leva ao aumento do volume e redução da densidade (Jr.; Popovich; Ansel, 2013). As formulações de hidrogéis F1 e F2 não obtiveram diferença nos valores de densidade durante os tempos avaliados, conforme mostram as Figuras 25 e 26.

Figura 25 - Densidade dos hidrogéis F1.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos HEC e HEC-PHT. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

Figura 26 - Densidade dos hidrogéis F2.



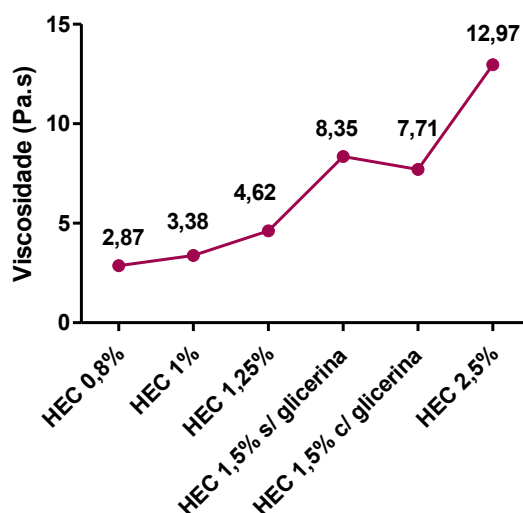
HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos HEC vs HEC-PHT. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

2.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada dos hidrogéis da formulação F3

Por conta das mudanças nas características físico-químicas observadas para as formulações F1 e F2 neste estudo, buscou-se alterar a concentração de polímero para se tentar corrigir as alterações observadas previamente. Para tanto foi realizado um teste da avaliação da viscosidade de hidrogéis contendo diferentes concentrações

de hidroxietilcelulose. Os valores da viscosidade e das diferentes concentrações de polímero estão mostrados no gráfico da Figura 27:

Figura 27 - Avaliação da viscosidade em 30 rpm de formulações de hidrogel com diferentes concentrações de hidroxietilcelulose.



Fonte: a autora.

Devido aos melhores resultados observados quando do uso do polímero na concentração de 1,5% de hidroxietilcelulose, esta concentração foi escolhida para o preparo das formulações F3. Ainda foi pensado em se adicionar a glicerina como agente umectante para prevenir a perda de água. As formulações F3 foram analisadas tanto em temperatura ambiente (F3A) como em câmara climatizada (F3E) a 40 °C e 75% UR. O estudo da estabilidade acelerada de F3 teve duração de 180 dias conforme pede a IN 15/2005 (MAPA, 2005).

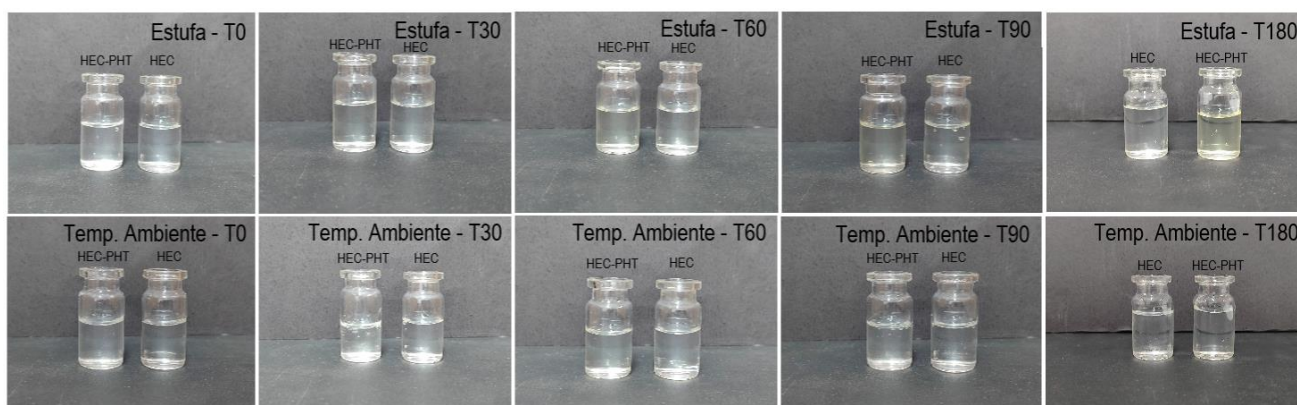
Não houve alterações nas características organolépticas dos hidrogéis F3 durante 180 dias conforme apresentado na Tabela 8 e a Figura 28:

Tabela 8 - Características organolépticas dos hidrogéis F3 armazenados em estufa e em temperatura ambiente.

PARÂMETROS									
ESTUFA	TEMPO	COR		ODOR		TURBIDEZ		SEDIMENTAÇÃO	
		HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC	HEC-PHT	HEC
	TEMPO 0	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 30	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 60	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 90	LA	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 180	LA	N	N	N	N	N	N	N
TEMPERATURA AMBIENTE	TEMPO 0	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 30	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 60	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 90	N	N	N	N	N	N	N	N
	TEMPO 180	N	N	N	N	N	N	N	N

Fonte: a autora. N- normal, sem alterações; LA- levemente alterado.

Figura 28 - Características organolépticas dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura de estufa em temperatura ambiente.



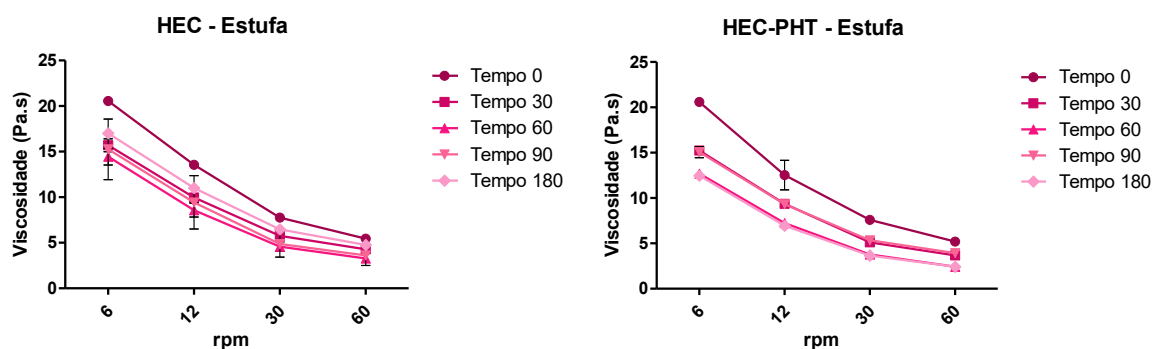
HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco).
Fonte: a autora.

Diante da avaliação das características organolépticas, a formulação que mais se manteve inalterada durante o tempo do estudo de estabilidade foi a F3.

Não houve diferença estatística da mudança de viscosidade durante os tempos de análise, mostrando que as alterações na F3 foram efetivas, garantindo a estabilidade dos hidrogéis até 180 dias (Figuras 29 e 30).

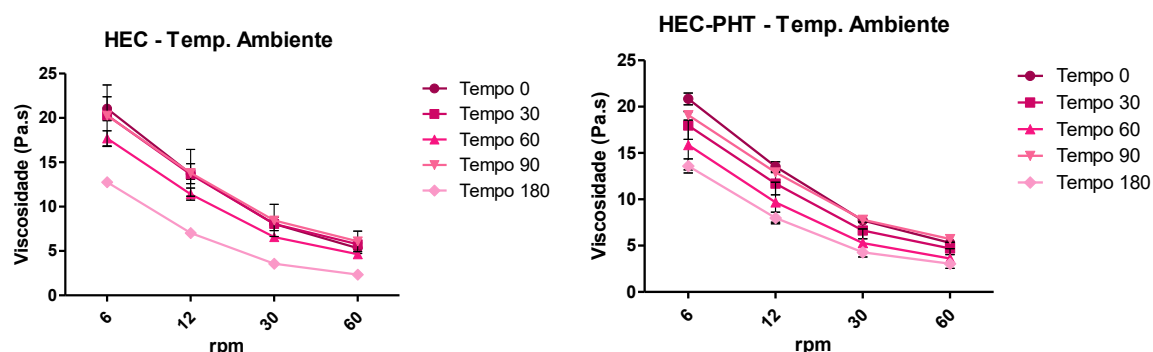
A viscosidade de um gel não deve muito alta para não dificultar a remoção do produto da embalagem e por geralmente géis muito viscosos possuem baixa espalhabilidade. Em contrapartida, a viscosidade não pode ser muito baixa para não prejudicar a aplicação do produto e comprometer o tratamento, como em casos em que o produto escorre (Indah; Rahmani; Zulkarnain, 2023).

Figura 29 - Viscosidade dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura de estufa.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco).
Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60 e 90. ANOVA com teste de Tukey.
Fonte: a autora.

Figura 30 - Viscosidade dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura ambiente.



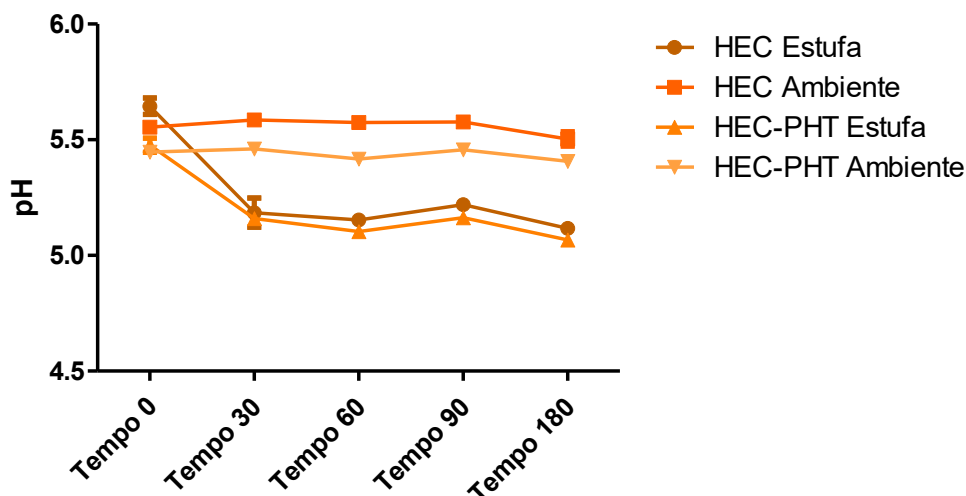
HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60 e 90. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

Os dados do hidrogel F3 mostraram que ele obteve uma viscosidade suficiente para dar uma boa aderência na pele e uma fácil aplicação visto que a viscosidade diminui com o atrito.

Não houve alteração nos valores de pH dos hidrogéis F3A, tanto do branco HEC quanto de HEC-PHT. Houve uma discreta redução nos valores de pH dos hidrogéis F3E armazenados em estufa. Essa alteração foi observada (Figura 31) entre os tempos 0 e 30 e após, até o tempo 90, os valores de pH se mantiveram estáveis. Da mesma forma, as formulações F1 e F2 também apresentaram redução de pH entre os tempos 0 e 30, e após os valores se estabilizaram. A temperatura pode acelerar a velocidade de degradação de ativos e é importante que sejam realizadas análises químicas desses hidrogéis para avaliar se a causa da redução dos valores de pH dos hidrogéis foi decorrente da degradação dos peptídeos e liberação de aminoácidos livres de caráter ácido.

Os valores de pH encontrados estão de acordo com o esperado de formulações tópicas, pois valores de pH muito baixos ou muito altos podem irritar a pele, prejudicando o tratamento para o qual o gel foi desenvolvido (Indah; Rahmani; Zulkarnain, 2023).

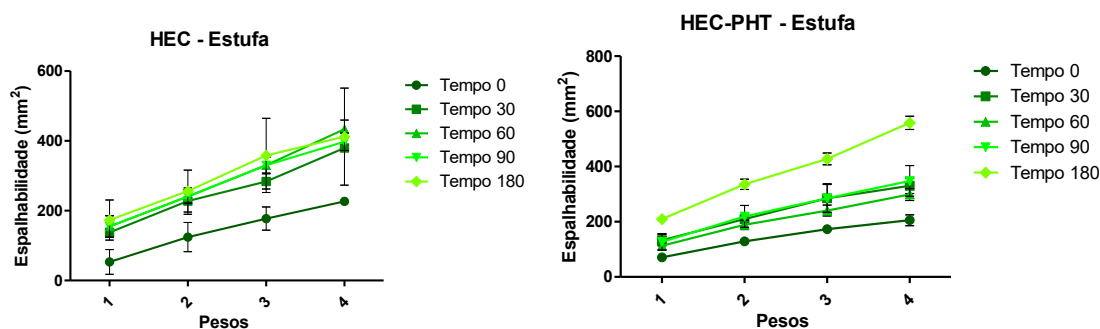
Figura 31 - Avaliação do pH dos hidrogéis F3.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p < 0,05$ (ANOVA com teste de Tukey) para os grupos HEC ambiente vs HEC-PHT estufa. Fonte: a autora.

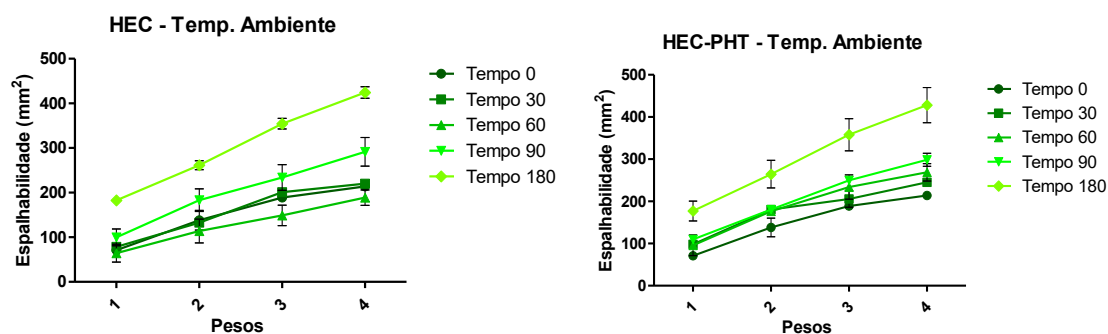
As formulações F3 (Figura 32 e 33) não apresentaram alterações de espalhabilidade no período de 90 dias, tanto para o hidrogel armazenado em estufa, quanto para o armazenado em temperatura ambiente. Entretanto, o Tempo 180 da formulação armazenada em estufa apresentou alteração de espalhabilidade em relação ao Tempo 0.

Figura 32 - Espalhabilidade dos hidrogéis F3 armazenados em estufa.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60, 90 e 180 para HEC e $p < 0,05$ para os grupos Tempo 0 e 180 do hidrogel HEC-PHT. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

Figura 33 – Espalhabilidade dos hidrogéis F3 armazenados em temperatura ambiente.

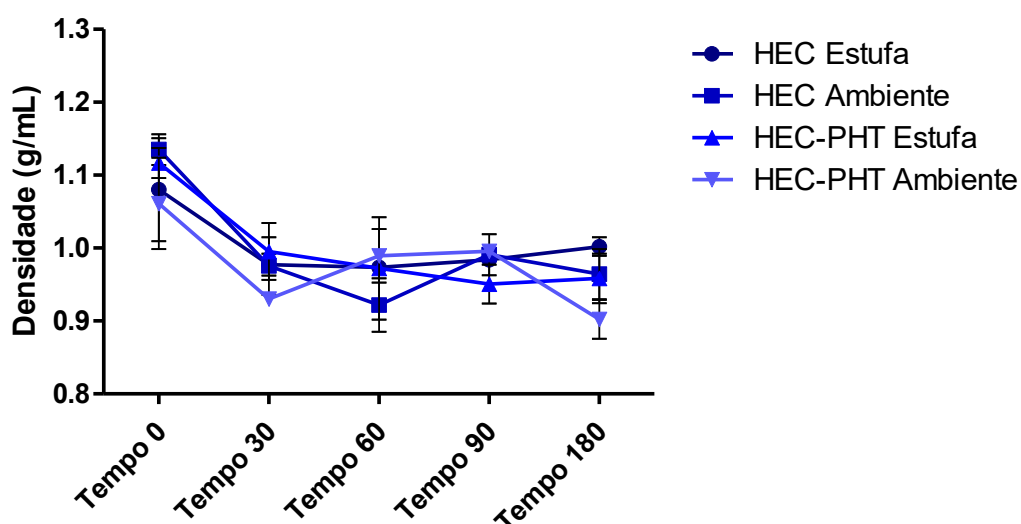


HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos Tempo 0, 30, 60, 90 e 180. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

Conforme já mencionado, a espalhabilidade informa sobre a facilidade que um produto é aplicado sobre a região em questão e em como o medicamento será distribuído a toda a área da lesão (Indah; Rahmani; Zulkarnain, 2023). A espalhabilidade das formulações F3 estão de acordo com os dados obtidos de viscosidade, os quais são inversamente proporcionais.

Da mesma forma que para os outros parâmetros, não houve alteração nos valores do parâmetro de densidade para os hidrogéis F3 (Figura 34).

Figura 34 - Densidade aparente dos hidrogéis F3.



HEC-PHT: hidrogel com peptídeo de tilápia; HEC: hidrogel sem peptídeo (branco). Valor de $p > 0,05$ para os grupos HEC e HEC-PHT. ANOVA com teste de Tukey. Fonte: a autora.

O estudo de estabilidade da formulação F3 mostrou que ela se manteve estável durante 180 dias de armazenamento, tanto em estufa quanto em temperatura ambiente. Sendo, esta formulação foi a escolhida para se proceder com os estudos clínicos que serão apresentados em seguida.

2.4.3 Estudo clínico do hidrogel F3 em animais de companhia

2.4.3.1 Avaliação da cicatrização de feridas por primeira intenção

A cicatrização de feridas pode ser dividida em cicatrização por primeira intenção ou por segunda intenção. Feridas que cicatrizam por primeira intenção possuem suturas, cicatrizam rapidamente e geralmente não formam cicatrizes espessas. A cicatrização por segunda intenção acontece quando a ferida cicatriza sem a presença de suturas e é necessário que ela seja limpa, hidratada e protegida regularmente (Perc; Erjavec, 2022).

A avaliação dos parâmetros de feridas por primeira intenção tratadas com hidrogel de PHT por 7 dias não apresentou melhora significativa para aspecto da ferida (Tabela 9), tecido de granulação (Tabela 10), cor da ferida (Tabela 11) e bordas da ferida (Tabela 13) em relação ao grupo controle tratado com hidrogel sem ativo. Entretanto, houve mudança significativa quanto à presença de sinais de infecção no grupo tratado. O grupo tratado apresentou menos sinais de infecção do que o grupo controle (Tabela 12).

Tabela 9 - Aspecto da ferida no 7º dia.

Score	Grupo tratamento	Grupo controle
0	0	1
1	6	9
2	9	6
3	6	4

Fonte: a autora. Scores: 0 – Sem sinais de cicatrização; 1 – Início da cicatrização, mas com sinais de inflamação; 2 – Cicatrização em processo, sem sinais de inflamação; 3 – Cicatrização completa, sem sinais de inflamação ($p > 0,05$, *chi-square*).

Tabela 10 - Tecido de granulação no 7º dia.

Score	Grupo tratamento	Grupo controle
0	7	4
1	8	11
2	5	3
3	0	2

Fonte: a autora. Scores: 0 – Ausente; 1 – Mínimo; 2 – Moderado; 3 – Abundante ($p > 0,05$, *chi-square*).

Tabela 11 - Cor da ferida no 7º dia.

Score	Grupo tratamento	Grupo controle
0	7	4
1	8	11
2	5	3
3	0	2

Fonte: a autora. Scores: 0 – Cor normal da pele circundante; 1 – Rosa Claro; 2 – Rosa Claro ou avermelhada; 3 – Vermelha intensa ou púrpura ($p > 0,05$, *chi-square*).

Tabela 12 - Sinais de infecção no 7º dia.

Sinais de infecção	Grupo tratamento	Grupo controle
Sim	3 ^a	9 ^b
Não	18 ^c	11 ^d

Fonte: a autora. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$, *chi-square*).

Tabela 13 - Bordas da ferida no 7º dia.

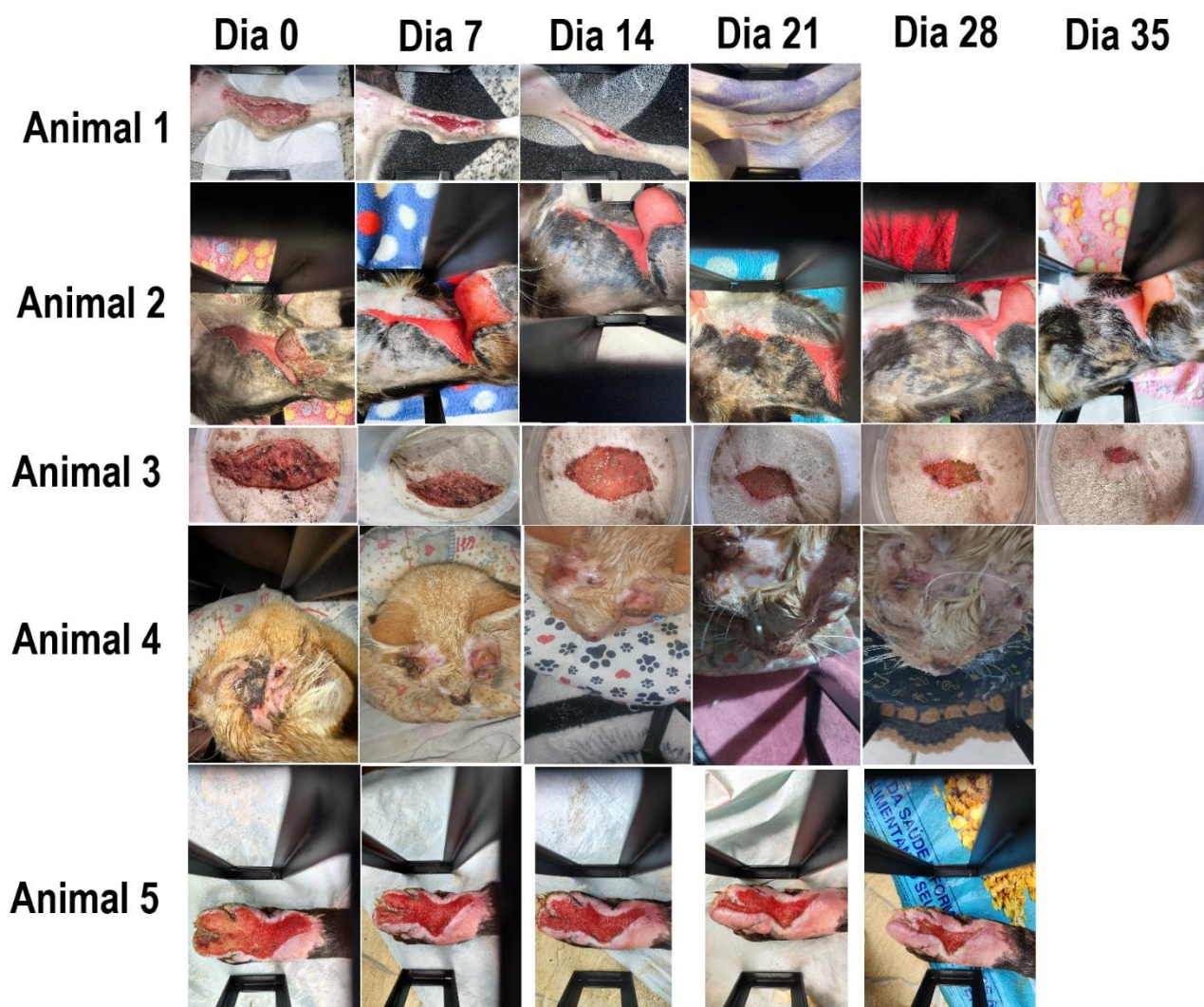
Score	Grupo tratamento	Grupo controle
0	6	9
1	5	6
2	7	2
3	2	2

Fonte: a autora. Scores: 0 – Ausente ou irregular; 1 – Início da uniformidade; 2 – Bordas uniformes; 3 – Borda bem definida e lisa ($p > 0,05$, *chi-square*).

2.4.3.2 Avaliação da cicatrização de feridas por segunda intenção

A avaliação da cicatrização de feridas abertas tratadas com o hidrogel de PHT na concentração de 1mg/mL mostrou redução no tamanho da ferida a partir de 7 dias de tratamento (Figura 35). A tabela 14 apresenta as características dos animais que compuseram o grupo tratamento. Na imagem abaixo, é possível observar a formação de tecido de granulação, coloração da ferida mais avermelhada, entre os dias 0 e 7 para os animais 1 e 2.

Figura 35 - Avaliação da retração da ferida dos animais 1-5 (Grupo Tratamento) dos dias 0 ao 35.



Fonte: a autora.

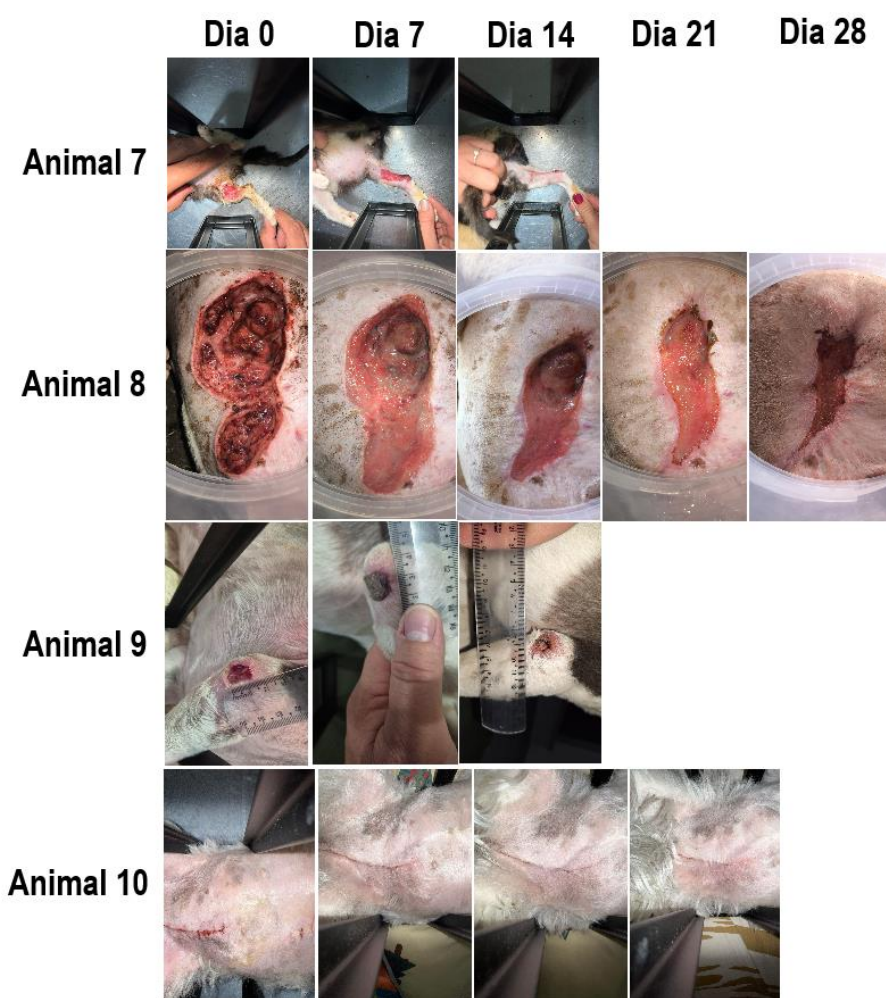
Tabela 14 - Características dos animais do Grupo Tratamento.

Características	Total (n=6)	Ferida Aguda	Ferida Crônica
Espécies			
Cachorro ^a	4	3	1
Gato ^b	2	1	1
Média de idade, anos	5,3	2,75	10,5
Sexo			
Macho	4	2	2
Fêmea	2	2	0

a- SRD, rottweiler, pit bull; b- SRD- Raça não definida. Fonte: a autora.

A figura 36 mostra as feridas dos animais tratados com Regepil (Grupo Controle) e a Tabela 15 apresenta as características destes animais.

Figura 36 - Avaliação da retração da ferida dos animais 7-10 do Grupo Controle dos dias 7 a 28.



Fonte: a autora.

Tabela 15 - Características dos animais do Grupo Controle.

Características	Total (n=4)	Ferida Aguda	Ferida Crônica
Espécies			
Cachorro ^a	3	2	1
Gato ^b	1	1	0
Média de idade, anos	6,83	5,78	10
Sexo			
Macho	2	1	1
Fêmea	2	2	0

a- Pit bull, fox paulistinha, lhasa apso; b- SRD- Raça não definida. Fonte: a autora.

As tabelas a seguir (Tabelas 16 e 17) resumem as características das feridas dos animais dos grupos Tratamento e Controle.

Tabela 16 - Características das feridas dos animais estudados do Grupo Tratamento.

Características	Total (n=6)	Ferida Aguda	Ferida Crônica	Identificação do Animal
Localização				
Pata dianteira	1	0	1	Animal 5
Braço	1	1	0	Animal 1
Pescoço	1	1	0	Animal 6
Abdômen	2	2	0	Animais 2 e 3
Face	1	0	1	Animal 4
Joelho	0	0	0	---
Etiologia				
Trauma	4	3	1	Animais 1, 2, 5 e 6
Lesão por pressão	0	0	0	---
Mordida	0	0	0	---
Incisão cirúrgica	1	1	0	Animal 3
Tumor	1	0	1	Animal 4
Comorbidades				
Anemia e/ou desnutrição	1	0	1	Animal 5
Doenças neoplásicas	3	1	2	Animais 3, 4 e 5
Osteomielite crônica	1	0	1	Animal 5

Fonte: a autora.

Tabela 17 - Características das feridas dos animais estudados do Grupo Controle.

Características	Total (n=4)	Ferida Aguda	Ferida Crônica	Identificação do animal
Localização				
Pata dianteira	0	0	0	---
Braço	1	1	0	Animal 7
Pescoço	0	0	0	---
Abdômen	2	2	0	Animais 8 e 10
Face	0	0	0	---
Joelho	1	0	1	Animal 9
Etiologia				
Trauma	0	0	0	---
Lesão por pressão	1	0	1	Animal 9
Mordida	1	1	0	Animal 7
Incisão cirúrgica	2	2	0	Animais 8 e 10
Tumor	0	0	0	---
Comorbidades				
Anemia e/ou desnutrição	0	0	0	---
Doenças neoplásicas	2	2	0	Animais 8 e 10
Osteomielite crônica	0	0	0	---

Fonte: a autora.

Os peptídeos da pele de tilápia aumentam a proliferação e diferenciação de fibroblastos e das células epiteliais, melhorando as taxas de reepitelização. Além disso, eles melhoram a fase inflamatória do processo de cicatrização. Citocinas inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) diminuíram em animais tratados com peptídeos de tilápia. Os peptídeos também já demonstraram regular o processo de angiogênese ao estimular o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2). Essa regulação pode ser pela suposta ação dos peptídeos na expressão de STAT3, um fator de transcrição que ativa o gene de expressão de VEGF) (Bustaman; Soekmadji; Sanjaya, 2025).

O processo de cicatrização também é regulado pelas metaloproteinases da matriz (MMP) que estão envolvidas nas fases iniciais (fase inflamatória). MMP-2 na adesão e agregação plaquetária, degrada biofilme presente e estimula a proliferação e migração de queratinócitos. Entretanto, a concentração de MMP-2 diminui quando

a fase inflamatória passa para a fase de proliferação e a constante presença dessas enzimas são indicadores de feridas crônicas (Wijaya *et al.*, 2023).

Peptídeos da pele da tilápia já demonstraram efeito inibitório de MMPs, como o peptídeo isolado YGDEY (Tyr-Gly-Asp-Glu-Tyr) que inibiu a expressão de MMP-1 (colagenase) e MMP-9 (gelatinase) (Xiao *et al.*, 2019). Em outro estudo os peptídeos do hidrolisado DLBS3D33 apresentaram efeito inibitório de MMP-2 (Wijaya *et al.*, 2023).

As análises da avaliação da área da ferida mostraram redução a partir do dia 7 de tratamento para os animais tanto do Grupo Tratamento quando do Grupo Controle (Tabela 18 e Figura 37).

Tabela 18 - Área e retração das feridas dos animais dos Grupos Tratamento e Controle.

Grupo Tratamento

Identificação do animal	Sexo	Idade	Área da ferida (mm2)				Retração da ferida (%)		
			Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Animal 1	F	1	3,405	1,679	0,501	0,034	50,678	85,278	99,001
Animal 2	F	2	14,306	7,866	5,358	6,556	45,009	62,542	54,117
Animal 3	M	6	70,327	63,983	52,811	22,823	9,021	24,907	67,546
Animal 4	M	11	12,458	3,996	1,874	3,759	67,906	84,966	69,837
Animal 5	M	10	35,044	22,571	20,210	13,448	35,586	42,328	61,616

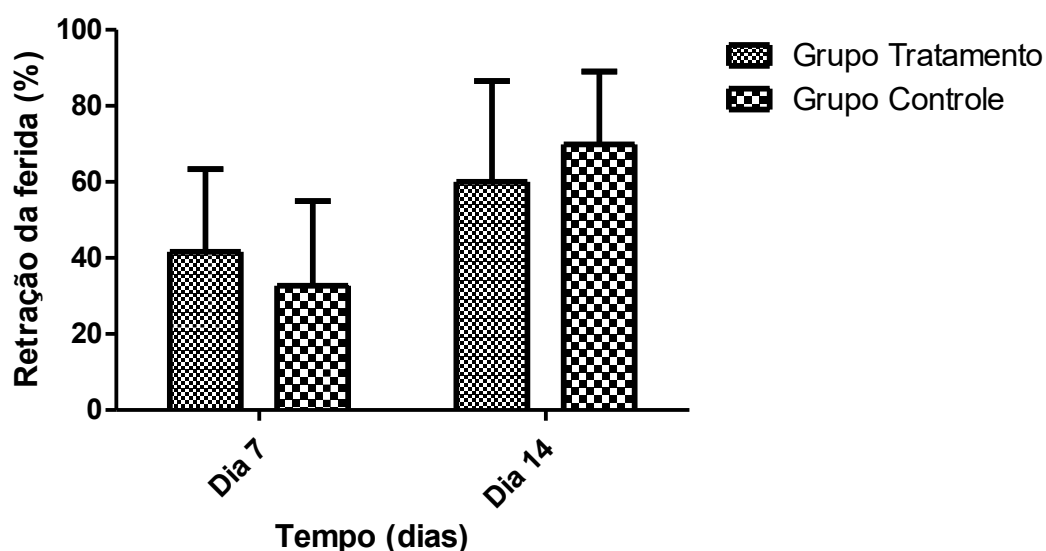
Grupo Controle

Identificação do animal	Sexo	Idade	Área da ferida (mm2)				Retração da ferida (%)		
			Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Animal 7	F	2 meses	5,653	2,267	0,271	---	59,837	95,192	---

Animal 8	M	6	100,99 2	91,091	47,378	41,77 7	9,793	53,084	58,626
Animal 9	M	10	1,693	1,349	0,728	---	20,286	57,025	---
Animal 10	F	11	0,961	0,567	0,249	0,07	40,922	74,148	92,709

Fonte: a autora.

Figura 37 - Retração da ferida para os Grupos Tratamento e Controle nos dias 7 e 14 incluindo todos os animais.



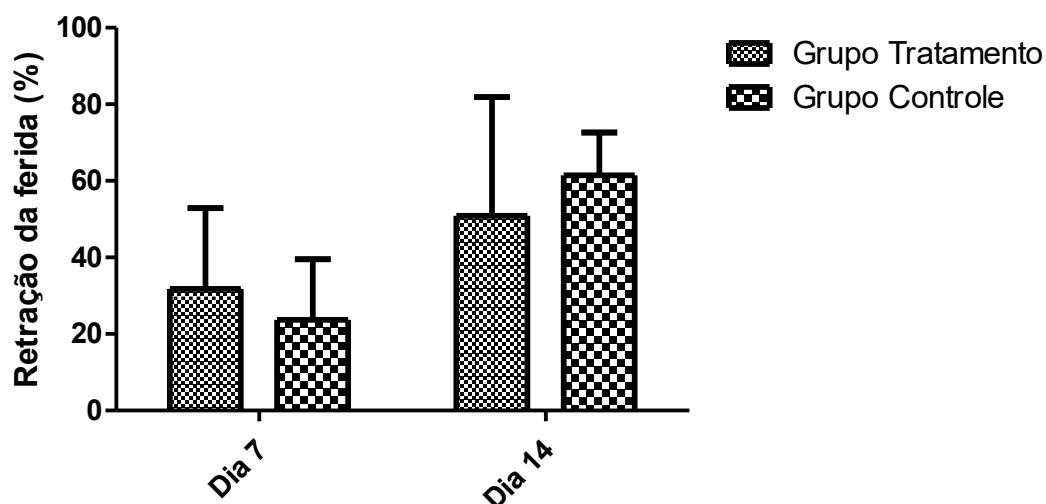
ANOVA de duas-vias com teste de Bonferroni. A diferença entre os Grupos Tratamento e Controle não foi considerada significativa ($p > 0,05$) nos dois tempos em que foi comparada. Fonte: a autora.

Deve-se levar em conta a diferença na cicatrização entre cães e gatos. Os cachorros possuem uma maior quantidade de vasos sanguíneos, o que aumenta a perfusão tecidual. Os gatos possuem uma perfusão cutânea diminuída na primeira semana de cicatrização quando comparados aos cães; entretanto, essa diferença não é observada nas semanas seguintes. Os gatos produzem menos tecido de granulação durante a cicatrização por segunda intenção quando comparados aos cães e a localização desse tecido nos gatos é mais periférica. Esse fator pode levar numa cicatrização e contração mais lenta nos gatos (Balsa, 2015; Lux, 2022).

A figura abaixo (Figura 38) mostra que não houve interferência da presença dos gatos (animais 2 e 4 do Grupo Tratamento e animal 7 do Grupo Controle) nos

resultados estatísticos do estudo clínico e não houve diferença significativa sem considerá-los.

Figura 38 - Retração da ferida para os Grupos Tratamento e Controle nos dias 7 e 14 incluindo apenas os cães.



ANOVA de duas-vias com teste de Bonferroni. A diferença entre os Grupos Tratamento e Controle não foi considerada significativa ($p > 0,05$) nos dois tempos em que foi comparada. Fonte: a autora.

Não foi possível a análise da porcentagem da área da ferida que foi reduzida para o animal 6 pela falta de padronização da distância das imagens. Entretanto, é possível observar, de acordo com a Figura 39, que houve evolução clínica e ao final do estudo, no dia 35, a ferida estava completamente fechada.

Figura 39 - Evolução da ferida do animal 6 (Grupo Tratamento).



Fonte: a autora

É importante ressaltar que neste estudo clínico todos os animais ficaram sob observação e cuidado constante para evitar lambidas e retirada do produto do local. Os animais foram mantidos com colar elizabetano quando necessário. Além do colar, o animal 5 também fez uso de atadura.

Diferentes pesquisas mostraram uma melhora no fechamento das feridas tratadas com peptídeos da pele de tilápia. Uma melhora foi observada por Cardoso *et al.* (2024), em que os grupos de camundongos tratados com esses peptídeos apresentou maior contração da ferida do que para o grupo controle no 9º dia. Da mesma forma, Elbialy *et al.* (2020) mostraram uma capacidade cicatrizante acelerada do colágeno de tilápia testados em ratos. Outro estudo mostrou melhora significativa a partir do 14º dia na retração de feridas de queimaduras em coelhos tratados com PHT em comparação com um curativo comercial (Hu *et al.*, 2017). Outros autores demonstraram que o tratamento com PHT obteve maior redução da ferida quando comparados com o tratamento com colágeno bovino e com fator de crescimento epidérmico (EGF) (Liu; Hsieh; Chen, 2022; Mukta *et al.*, 2024; Tozetto *et al.*, 2025). Esses dados corroboram com os resultados encontrados nesta pesquisa e reforçam o potencial cicatrizante dos peptídeos de tilápia.

Alguns fatores são conhecidos por atrasarem a cicatrização em animais. Entre os a) fatores inerentes do animal estão a presença de doenças endócrinas, idade avançada do animal, infecções ativas, estado nutritivo e disfunções em órgãos. Além destes fatores citados também são importantes os b) fatores locais da ferida (como a presença de tecido necrótico); c) a contração da ferida (principalmente em feridas por segunda intenção); d) movimento do animal (o qual pode influenciar a cicatrização em áreas com axilas, patas e região inguinal); e) presença de infecções, f) presença de hematomas e seromas, g) presença de corpos estranhos na ferida (como sementes, grama etc.) e h) interferência do paciente (lamber, coçar e morder a região machucada) (Aldridge, 2015). Os animais 4 e 5 do Grupo tratamento se encontram na condição de idade avançada. Além desse limitante da cicatrização, o animal 5 se encontrava em estado de anemia no início do tratamento, confirmado por exames laboratoriais. Outro fator comprometedor da melhora clínica deste animal foi as frequentes automutilações, em que o animal, mesmo com o uso de cone, coçava e mordida a ferida.

Animais em idade avançada se curam em menor velocidade do que animais mais novos. O tecido novo resultante da cicatrização de animais velhos tende a ser

mais frágil por conta das mudanças na estrutura do colágeno decorrente da idade. A má nutrição atrasa a cicatrização, visto que este processo requer maior aporte de proteínas. Quando o animal está subnutrido, existe um estado de catabolismo que irá levar à depleção de proteínas (Aldridge, 2015; Balsa, 2015).

O produto comercial utilizado no Grupo Controle é composto a base de tartarato de ketanserina e asiaticosídeo. De acordo com o boletim técnico do fabricante, a ketanserina é um antagonista de receptores serotoninérgicos tipo 5HT-2. Este receptor está presente na pele e está associado a respostas inflamatórias que promovem vasoconstrição e migração leucocitária. A ketanserina, por sua vez, irá causar vasodilatação local e redução da inflamação. O asiaticosídeo é o extrato da planta *Centella asiatica*, a qual possui efeitos antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatórios. A sua atividade cicatrizante está associada ao estímulo da síntese de colágeno (Gervásio; Alves; Carvalho, 2023). Este produto já foi eficaz em reduzir o tempo de cicatrização em cadelas submetidas à mastectomia, permitindo a retirada dos pontos antes do previsto por protocolo (Amâncio; Roberto; Luppi, 2021).

O estudo clínico mostrou que o hidrogel contendo peptídeos de pele de tilápia foi tão eficiente para reduzir o tempo de cicatrização em animais com feridas abertas quanto o produto comercial. O hidrogel de peptídeos apresentou a vantagem de ter uma melhor atividade durante a primeira semana de tratamento, em que prevalece a fase inflamatória do processo de cicatrização.

Este trabalho reforça a atividade cicatrizante destes peptídeos. Sendo assim, estudos em novas formas de feridas devem ser conduzidos e em espécies diferentes, como o ser humano, para avaliar a efetividade desta formulação como multifuncional.

CONCLUSÕES

A complexação do peptídeo hidrolisado de tilápia com zinco foi efetiva, como demonstrado pelas análises de FTIR e DRX, contudo apresentou rendimento baixo, tendo custo elevado para produção. O complexo PHT-Zn apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, entretanto são necessários mais estudos para avaliar a reprodutibilidade dos resultados, já que este foi um estudo inicial das atividades biológicas do complexo.

Os hidrogéis F3 foram os que melhor mantiveram as características organolépticas e físico-químicas durante os 90 dias do estudo de estabilidade acelerada, mostrando que a redução da concentração de hidroxietilcelulose de 2,5% para 1,5% e adição de glicerina foram eficientes para melhorar a estabilidade. A mesma formulação se manteve estável ao ser avaliada em 180 dias.

A avaliação clínica do hidrogel em cães contra feridas por primeira intenção não apresentou melhora significativa em relação ao controle branco para os parâmetros de aspecto da ferida, tecido de granulação, cor da ferida e bordas da ferida. Porém, apresentou diferença significativa quanto a presença de sinais de infecção, indicando que o hidrogel com peptídeos hidrolisados de tilápia (HEC-PHT) tem utilidade para feridas por primeira intenção. Ao serem avaliadas feridas por segunda intenção, pôde-se observar redução significativa na área da ferida tratada com HEC-PHT a partir da primeira semana de tratamento. Esses dados mostram que o hidrogel HEC-PHT é um possível candidato para ser uma opção para o tratamento de feridas complexas em cães e gatos. Os dados de comparação com o grupo controle apresentaram resultados que indicam que o hidrogel possui atividade cicatrizante tão potente quanto o produto comercial aplicado nos animais do grupo controle. Esse trabalho aponta que o hidrogel HEC-PHT pode se tornar uma nova opção de tratamento de feridas na clínica veterinária.

REFERÊNCIAS

AKASH, M. S. H.; REHMAN, K. **Drug stability and chemical kinetics**. Springer, pg. 147-154. 2020.

Anatomy of the Skin. BioRender Science Templates <https://www.biorender.com/template/anatomy-of-the-skin>.

AKAT, Esra; ARMAN, Sezgi; ANDERSON, Rodolfo; MEGÍAS, Manuel; AYAZ, Dinçer. Comparison of vertebrate skin structure at class level : A review. **The Anatomical Record**, [s. l.], vol. 305, no. February, p. 3543–3608, 2022.

ALZAIN, Mohammed; DAGHISTANI, Hussam; SHAMRANI, Taghreed; ALMOGHRABI, Yousef; DAGHISTANI, Yassir; ALHARBI, Ohood S; SAIT, Ahmad M; MUFRRIH, Mohammed; ALHAZMI, Wafaa; ALQARNI, Mona Abdulrahman; SALEH, Bandar Hasan; ZUBAIR, Manal A; JUMA, Noha A; NIYAZI, Hatoon A; NIYAZI, Hanouf A; HALABI, Waiei S; ALTALHI, Rawan. Antimicrobial Peptides : Mechanisms , Applications , and Therapeutic Potential. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], vol. 18, p. 4385–4426, 2025.

AMÂNCIO, Bruna Roberta; ROBERTO, Cangussú; LUPPI, Marta Maria Circhia Pinto. Avaliação cicatricial em cadelas submetidas à mastectomia unilateral com o uso de Tartarato de Ketanserina e Asiaticosídeo Cicatricial evaluation in bitches submitted to unilateral mastectomy with the use of KetanSerin and Asiaticoside Tarter. **Pubvet**, [s. l.], vol. 15, p. 1–6, 2021.

BANDARA, Subhani; CARNEGIE, Codi-anne; JOHNSON, Chevaun; AKINDOJU, Feyisayo; WILLIAMS, Ebonee; SWABY, Julia M; OKI, Aderemi; CARSON, Laura E. Synthesis and characterization of Zinc / Chitosan-Folic acid complex. **Heliyon**, [s. l.], no. October 2017, p. e00737, 2018. DOI 10.1016/j.heliyon.2018.e00737. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00737>.

BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], vol. 1767, p. 1073–1101, 2007.

BAYDOGAN, Berkay; KUCUK, Aslihan; KOZAN, Bensu; ERDAL, Merve; ABAS, Burcin Irem. Hydrogels Made with Tilapia Fish Skin Increase Collagen Production and Have an Effect on MMP-2 / MMP-9 Enzymes in Burn Treatment. [s. l.], , p. 1–16, 2025.

BORENA, Bizunesh M.; MARTENS, Ann; BROECKX, Sarah Y.; MEYER, Evelyne; CHIERS, Koen; DUCHATEAU, Luc; SPAAS, Jan H. Regenerative Skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], vol. 36, no. 1, p. 1–23, 2015.

BOYCE, Steven T.; LALLEY, Andrea L. Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care. **Burns & Trauma**, [s. l.], vol. 6, p. 1–10, 2018.

BRASIL, ANVISA. **Séries Temáticas- Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. [S. l.: s. n.], 2004. vol. 1.

BUSTAMAN, Andrew L.; SOEKMADJI, Peter N.; SANJAYA, Ardo. Nile tilapia skin in burn wound healing : A scoping review. **Burns**, [s. l.], vol. 51, no. 5, p. 107503, 2025. DOI 10.1016/j.burns.2025.107503. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2025.107503>. Acesso em: set/2025.

CAÑEDO-DORANTES, Luis; CAÑEDO-AYALA, Mara. Skin acute wound healing: A comprehensive review. **International Journal of Inflammation**, [s. l.], vol. 2019, 2019.

CARDOSO, Robert Rosostolato; SARANDY, Mariáurea Matias; DE OLIVEIRA, Leandro Licursi; DA MATTA, Sérgio Luis Pinto; NOVAES, Romulo Dias; GONÇALVES, Reggiani Vilela. Positive Effect of Peptides Obtained from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) on Inflammation Regulation and Wound Healing. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 11, no. 4, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cosmetics11040133>. Acesso em: jul/2025.

CHEN, Lei; SHEN, Xuanri; XIA, Guanghua. Effect of molecularweight of tilapia (*oreochromis niloticus*) skin collagen peptide fractions on zinc-chelating capacity and bioaccessibility of the zinc-peptide fractions complexes in vitro digestion. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], vol. 10, no. 6, 2020.

DA SILVA, Bruna L.; ABUÇAFY, Marina Paiva; MANAIA, Eloisa Berbel; JUNIOR, Augusto Oshiro; CHIARI-ANDRÉO, Bruna Galdorfini; R, Rosemeire C L; CHIAVACCI, Leila Aparecida. Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles : An Overview Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], vol. 14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S216204>. Acesso em: jul/2024.

ELBIALY, Zizy I.; ATIBA, Ayman; ABDELNABY, Aml; AL-HAWARY, Ibrahim I.; ELSHESHTAWY, Ahmed; EL-SEREHY, Hamed A.; ABDEL-DAIM, Mohamed M.; FADL, Sabreen E.; ASSAR, Doaa H. 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 veterinary research**, [s. l.], vol. 16, no. 1, p. 352, 2020.

EMRE ŞEFİK ÇAĞLAR, Gökçe KARAOTMARLI GÜVEN; OKUR, Neslihan ÜSTÜNDAĞ. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CARBOPOL BASED HYDROGELS CONTAINING DEXPANTHENOL. **J. Fac. Pharm.**, [s. l.], vol. 47, no. 3, p. 770–783, 2023.

ENNAAS, Nadia; HAMMAMI, Riadh; GOMAA, Ahmed; FRANÇOIS, B; SUBIRADE, Muriel; BEAULIEU, Lucie; FLISS, Ismail. Biochemical and Biophysical Research Communications Collagencin , an antibacterial peptide from fi sh collagen : Activity ,

structure and interaction dynamics with membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], vol. 473, p. 642–647, 2016.

GE, B; WANG, H; LI, J; LIU, H; YIN, Y; ZHANG, N; QIN, S. Comprehensive assessment of Nile tilapia skin. **Mar Drugs**, [s. l.], vol. 18, p. 178–194, 2021.

GERVÁSIO, Saulo de Oliveira; ALVES, Luciano Marra; CARVALHO, Rosângela de Oliveira Alves. **Associação de tartarato de ketanserina e asiaticosídeo (Regepil®) em ferida cutânea extensa de um cão**. [S. l.: s. n.], 2023.

GHOSH, Bikona; SÁNCHEZ-VELAZCO, Diana F.; PREM, Parvati; ALI, Anam Sayed Mushir; DOMINIQUE, Olivia; SHAH, Shahtaj Adil; OJEDA, Luis Morales; OBEYSEKERA, Dinali. Use of Nile tilapia fish skin in treatment for burn victims. **International Journal of Surgery: Global Health**, [s. l.], vol. 6, no. 5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/gh9.0000000000000257>. Acesso em: ago/2024.

GUSHIKEN, Lucas Fernando Sérgio; BESERRA, Fernando Pereira; BASTOS, Jairo Kenupp; JACKSON, Christopher John. Cutaneous Wound Healing : An Update from Physiopathology to Current Therapies. **life**, [s. l.], vol. 11, p. 1–15, 2021.

HOFFMANN, Aline Rodrigues; PATTERSON, Adam P; DIESEL, Alison; LAWHON, Sara D; LY, Hoai Jaclyn; STEINER, M; DOWD, Scot E; OLIVRY, Thierry; SUCHODOLSKI, Jan S. The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs. **PloS ONE**, [s. l.], vol. 9, no. 1, 2014.

HU, Zhang; YANG, Ping; ZHOU, Chunxia; LI, Sidong; HONG, Pengzhi. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. **Marine Drugs**, [s. l.], vol. 15, no. 4, 2017.

HUANG, Han Ning; CHAN, Yi Lin; HUI, Cho Fat; WU, Jen Leih; WU, Chang Jer; CHEN, Jyh Yih. Use of tilapia piscidin 3 (TP3) to protect against MRSA infection in mice with skin injuries. **Oncotarget**, [s. l.], vol. 6, no. 15, p. 12955–12969, 2015.

HUANG, Jyun-yuan; WONG, Tzyy-yue; TU, Ting-yuan; TANG, Ming-er; LIN, Hsi-hui. Assessment of Tilapia Skin Collagen for Biomedical Research Applications in Comparison with Mammalian Collagen. **Molecules**, [s. l.], vol. 29, 2024.

INDAH, Sanubari; RAHMANI, Putri; ZULKARNAIN, Abdul Karim. Optimization of HPMC and Na-CMC as Gelling Agents on Physical Properties and Stability in Sunflower Seed Oil Gel Formulation. **J.Food Pharm.Sci**, [s. l.], vol. 11, no. 2, p. 812–819, 2023.

KADIRA, Hossam I. Aging and Infection-Based Alterations in Collagen Type 1 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Skin. **Pakistan Journal of Zoology**, [s. l.], , p. 1–10,

2024.

KONG, Jilie; YU, Shaoning. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assign-. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, [s. l.], vol. 39, no. 20745001, p. 549–559, 2007.

LI, Chen; BU, Guanhao; CHEN, Fusheng; LI, Tanghao; LI, Chen; BU, Guanhao; CHEN, Fusheng; LI, Tanghao. Preparation and structural characterization of peanut peptide – zinc chelate Preparation and structural characterization of peanut peptide – zinc chelate. **CyTA - Journal of Food**, [s. l.], vol. 18, no. 1, p. 409–416, 2020.

LI, Xin; ZUO, Siyao; WANG, Bin; ZHANG, Kaiyu; WANG, Yang. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, [s. l.], vol. 27, p. 1–29, 2022.

LIMA-JUNIOR, Edmar Maciel; PICOLLO, Nelson Sarto; MIRANDA, Marcelo José Borges de; RIBEIRO, Wesley Lyevertton Correia; ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes; FERREIRA, Guilherme Emilio; PARENTE, Ezequiel Aguiar; MORAES-FILHO, Manoel Odorico. The use of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), as an occlusive biological dressing , in the treatment of burn wounds. **Rev Bras Queimaduras.**, [s. l.], vol. 16, no. 1, p. 10–17, 2017. Disponível em: <http://rbqueimaduras.org.br/details/341/pt-BR/uso-da-pele-de-tilapia--oreochromis-niloticus---como-curativo-biologico-oclusivo--no-tratamento-de-queimaduras>. Acesso em: ago/2025.

LIN, Pei Hui; SERMERSHEIM, Matthew; LI, Haichang; LEE, Peter H.U.; STEINBERG, Steven M.; MA, Jianjie. Zinc in wound healing modulation. **Nutrients**, [s. l.], vol. 10, no. 1, p. 1–20, 2018.

LIN, Yanlan; TANG, Xu; XU, Liangzong; WANG, Shaoyun. Antibacterial properties and possible action mechanism of chelating peptides-zinc nanocomposite against *Escherichia coli*. **Food Control**, [s. l.], vol. 106, no. May, 2019a.

LIN, Yanlan; TANG, Xu; XU, Liangzong; WANG, Shaoyun. Antibacterial properties and possible action mechanism of chelating peptides-zinc nanocomposite against *Escherichia coli*. **Food Control**, [s. l.], vol. 106, no. June, 2019b.

LIU, Chia Wen; HSIEH, Chu Yi; CHEN, Jyh Yih. Investigations on the Wound Healing Potential of Tilapia Piscidin (TP) 2-5 and TP2-6. **Marine Drugs**, [s. l.], vol. 20, no. 3, p. 2–5, 2022.

MENEZES, Maria do L.Linhares Rodrigues; RIBEIRO, Hálisson Lucas; ABREU, Flávia de Oliveira M.da Silva; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; FILHO, Men de Sá Moreira de S. Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], vol. 189, no. January, p. 110852, 2020.

MENG, Keke; CHEN, Lei; XIA, Guanghua; SHEN, Xuanri. Effects of zinc sulfate and zinc lactate on the properties of tilapia (*Oreochromis Niloticus*) skin collagen peptide chelate zinc. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 347, no. December 2020, p. 129043, 2021.

MORETTA, Antonio; SCIEUZO, Carmen; PETRONE, Anna Maria; SALVIA, Rosanna; MANNIELLO, Michele Dario; FRANCO, Antonio; LUCCHETTI, Donatella; VASSALLO, Antonio; VOGEL, Heiko; SGAMBATO, Alessandro; FALABELLA, Patrizia. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], vol. 11, no. June, p. 1–26, 2021.

MUKTA, Nasima Akter; AHMED, Samina; SARWARUDDIN CHOWDHURY, A. M.; TAREQ, Shafi M.; SAJIB, Abu Ashfaque; BASHAR, M. S.; HAQUE, Papia. Effect of core–sheath bi-polymeric scaffolds fabricated from acid-soluble collagen and poly(lactic acid) derivatives on wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], vol. 141, no. 28, p. 1–16, 2024.

NATALE, Concetta Di; BENEDICTIS, Ilaria De; BENEDICTIS, Arianna De; MARASCO, Daniela. Metal – Peptide Complexes as Promising Antibiotics to Fight Emerging Drug Resistance : New Perspectives in Tuberculosis. **Antibiotics**, [s. l.], vol. 9, p. 1–22, 2020.

NG, Wen-jie; WONG, Fai-chu; MANAN, Fazilah Abd; CHOW, Yit-lai; OOI, Ai-lin; ONG, Mei-kying; ZHANG, Xuewu; CHAI, Tsun-thai. Antioxidant Peptides and Protein Hydrolysates from Tilapia : Cellular and In Vivo Evidences for Human Health Benefits. [s. l.], no. i, p. 1–22, 2024.

Bakhrushina E.; N, Anurova M.; S., Zavalniy M.; B., Demina N.; A., Krasnyuk I. DERMATOLOGIC GELS SPREADABILITY MEASURING METHODS COMPARATIVE STUDY. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, [s. l.], vol. 14, no. 1, 2021.

OUYANG, Qian Qian; HU, Zhang; LIN, Zhen Peng; QUAN, Wei Yan; DENG, Yi Feng; LI, Si Dong; LI, Pu Wang; CHEN, Yu. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], vol. 112, p. 1191–1198, 2018.

PERC, B; ERJAVEC, V. Overview of Wound Healing Differences between Dogs and Cats. **Proceedings of Socratic Lectures.**, [s. l.], vol. 7, p. 167–171, 2022.

POTAROS, Treesin; RAKSAKULTHAI, Nongnuch; RUNGLERDKREANGKRAI, Jiraporn. Characteristics of Collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Isolated by Two Different Methods. [s. l.], vol. 593, p. 584–593, 2009.

RAHMAN, Mashur; HUDA, Mainul; HASAN, Anamul; KHAN, Mala. Biomedical applications of collagen : A Review. **REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND**

PHARMACOKINETICS, [s. l.], vol. 38, no. March, p. 73–86, 2024.

REN, Yao; WU, Hui; CHI, Yuanlong; DENG, Ruijie; HE, Qiang. Structural characterization, erythrocyte protection, and antifatigue effect of antioxidant collagen peptides from tilapia (: *Oreochromis nilotica* L.) skin. **Food and Function**, [s. l.], vol. 11, no. 11, p. 10149–10160, 2020.

RISALITI, Laura; YU, Xuan; VANTI, Giulia; CAMILLA, Maria; WANG, Meng; RITA, Anna. International Journal of Biological Macromolecules Hydroxyethyl cellulose hydrogel for skin delivery of khellin loaded in ascosomes : Characterization , in vitro / in vivo performance and acute toxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], vol. 179, p. 217–229, 2021.

SCHLAKE, Alexander; DEVRIENDT, Nausikaa; AL., Et. Influence of age , sex , body condition score , rectal temperature , anatomical location and hair on skin pH in dogs. **Veterinary Dermatology**, [s. l.], , p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.13011>. Acesso em: out/2025.

SHEN, Annabel Z; TAHA, Mohamad; GHANNOUM, Mahmoud; TYRING, Stephen K. Biofilms and Chronic Wounds : Pathogenesis and Treatment Options. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], vol. 14, p. 1–13, 2025.

SILVA, Aline Maia; PINHEIRO, Breno Queiroz; MORAIS, Glayciane Bezerra de; FERREIRA, Tiago Cunha. **Tópicos Em Sanidade De Cães E Gatos, Volume 4**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.47242/978-65-87959-17-7>. Acesso em: out/2025.

SORG, Heiko; TILKORN, Daniel J.; HAGER, Stephan; HAUSER, Jörg; MIRASTSCHISKI, Ursula. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, [s. l.], vol. 58, no. 1–2, p. 81–94, 2017.

SOUICI, Laurent; DENESVRE, Caroline. 3D skin models in domestic animals. **Veterinary Research**, [s. l.], vol. 52, no. 21, p. 1–15, 2021.

TALAPKO, Jasminka; MEŠTROVI, Tomislav; JUZBAŠI, Martina. Antimicrobial Peptides — Mechanisms of Action , Antimicrobial Effects and Clinical Applications. **Antibiotics**, [s. l.], vol. 11, no. 147, 2022.

TEMBHARE, Ekta; GUPTA, Krishna Radheshyam; UMEKAR, Milind Janrao. An Approach to Drug Stability Studies and Shelf-life Determination. **Archives of Current Research International**, [s. l.], vol. 19, no. 1, p. 1–20, 2019.

TOTTOLI, Erika Maria; DORATI, Rossella; GENTA, Ida; CHIESA, Enrica; PISANI, Silvia. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound

Care and Regeneration. [s. l.], 2020.

TOZETTO, Rodrigo; MACEDO, Julia B De; LETICIA, Thais; SILVA, M; VENTURA, Ana Carolina T; FERRARI, Priscileila C. Evaluation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Peptides for Wound Healing : A Systematic and Meta-Analysis Review. [s. l.], 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5c01219>. Acesso em: dez/2025.

TOZETTO, Rodrigo; SANTOS ROCHA, Beatriz; ASSIS DE ANDRADE, Evelyn; STOLZ CRUZ, Luiza; DA ROSA, Rosana Letícia; MACHINSKI, Isadora; LEMOS DE OLIVEIRA, Évelin; BORGES MONTEIRO, Jessica Raquel; KOGA, Adriana Yuriko; CAVALCANTE LIPINSKI, Leandro; MEURER, Eduardo César; KITAGAWA, Rodrigo Rezende; BELTRAME, Flávio Luís. Study of the Antioxidant, Antimicrobial, and Wound Healing Properties of Raw Hydrolyzed Extract from Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*). **Chemistry and Biodiversity**, [s. l.], vol. 20, no. 11, 2023.

TUDOROIU, Elena-emilia; ALBU, Georgiana; DINU-PÎRVU, Cristina Elena; VISILEANU, Emilia; KAYA, Durmus Alpaslan; ANUT, Valentina. Development of Smart pH-Sensitive Collagen- Hydroxyethylcellulose Films with Naproxen for Burn Wound Healing. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 18, p. 1–22, 2025.

UDECHUKWU, M Chinonye; COLLINS, Stephanie A; UDENIGWE, Chibuike C. Function. [s. l.], p. 4137–4144, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6fo00706f>. Acesso em: nov/2024.

USOLTSEV, Dmitrii; SITNIKOVA, Vera; KAJAVA, Andrey; USPENSKAYA, Mayya. Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions. **Biomolecules**, [s. l.], vol. 9, p. 1–17, 2019.

VARDAN, Victor. Influence of pH on the Stability of Pharmaceutical Compounds in Japan Influence of pH on the Stability of Pharmaceutical Compounds in Japan. **Journal of Chemistry**, [s. l.], vol. 2, p. 21–30, 2024.

WANG, Chan; LI, Bo; WANG, Bo; XIE, Ningning. Degradation and antioxidant activities of peptides and zinc-peptide complexes during in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 173, p. 733–740, 2015.

WANG, Enzhao; QI, Zhaoying; CAO, Yuzhou; LI, Ruixiang; WU, Jing; TANG, Rongshuang; GAO, Yi; DU, Ruofei; LIU, Minchen. Gels as Promising Delivery Systems : Physicochemical Property Characterization and Recent Applications wound. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 17, 2025.

WANG, Kuiming; CAO, Rui; DONG, Huijun. Diversity of Collagen Proteins and Their Biomedical Applications in Drug Delivery. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], vol.

15, p. 1–20, 2025.

WIJAYA, Sherlyn P; RAHAYU, Puji; SUHARTONO, Maggy T; TJANDRAWINATA, Raymond. Molecular studies of bioactive peptides of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin protein hydrolysate DLBS3D33 as MMP-2 inhibitor. [s. l.], vol. 13, no. 04, p. 186–198, 2023.

WOSICKA-FRACKOWIAK, H.; PONIEDZIAŁEK, K.; WOZNY, S.; KUPRIANOWICZ, M.; NYGA, M.; JADACH, B.; MILANOWSKI, B. Collagen and Its Derivatives Serving Biomedical Purposes : **Polymers**, [s. l.], vol. 16, p. 1–36, 2024.

XIAO, Zhenbang; LIANG, Peng; CHEN, Jiali; CHEN, Mei-Fang; GONG, Fang; LI, Chengyong; ZHOU, Chunxia; HONG, Pengzhi; YANG, Ping; QIAN, Zhong-Ji. A Peptide YGDEY from Tilapia Gelatin Hydrolysates Inhibits UVB-mediated Skin Photoaging by Regulating MMP-1 and MMP-9 Expression in HaCaT Cells. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], vol. 95, no. 6, p. 1424–1432, 1 Nov. 2019.

YAN, Mingyan; JIANG, Xiujie; WANG, Gaochao; WANG, Ailing; WANG, Xinxin; WANG, Xinyu; ZHAO, Xiaochen; XU, Hao; AN, Xiangsheng; LI, Yinpeng. Preparation of self-assembled collagen fibrillar gel from tilapia skin and its formation in presence of acidic polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], vol. 233, no. October 2019, p. 115831, 2020.

ZHANG, Ruilin; CHEN, Jian; JIANG, Xiongwu; YIN, Lasheng; ZHANG, Xuewu. Original article Antioxidant and hypoglycaemic effects of tilapia skin collagen peptide in mice. [s. l.], , p. 2157–2163, 2016. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13193>.

ANEXO A – FICHA DE AVALIAÇÃO CICATRICIAL

Informações do paciente:

() **Grupo controle**

() **Grupo tratamento**

Nº do paciente: _____

Data da cirurgia: _____

1) Tamanho aproximado da lesão em centímetros 1º dia:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

2) Aspecto da Ferida 7º dia:

0	Sem sinais de cicatrização
1	Início da cicatrização, mas com sinais de inflamação
2	Cicatrização em progresso, sem sinais de inflamação
3	Cicatrização completa, sem sinais de inflamação

3) Tecido de granulação 7º dia:

0	Ausente
1	Mínimo
2	Moderado
3	Abundante

4) Cor da ferida 7º dia:

0	Cor normal da pele circundante
1	Rosa claro
2	Rosa claro ou avermelhada
3	Vermelha intensa ou púrpura

5) Sinais de Infecção 7º dia:

1	SIM	2	NÃO
---	-----	---	-----

0	Calor local
1	Edema
2	Rubor
3	Dor aumentada

6) Bordas da Ferida 7º dia:

0	Ausente ou irregular
1	Início da uniformidade
2	Bordas uniformes
3	Borda bem definida e lisa

7) Tamanho aproximado da Lesão em centímetros 7º dia:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----