

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS - PPGCEM  
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**HENRIQUE BORBA MODOLON**

**EXTRAÇÃO, SECAGEM E APLICAÇÃO DO COLÁGENO DE PELES DE TILÁPIA  
EM MEMBRANAS ELETROFIADAS PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL**

**CRICIÚMA**

**2024**

**HENRIQUE BORBA MODOLON**

**EXTRAÇÃO, SECAGEM E APLICAÇÃO DO COLÁGENO DE PELES DE TILÁPIA  
EM MEMBRANAS ELETROFIADAS PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Sabrina Arcaro  
Coorientador: Prof. Dr. Oscar Rubem Klegues Montedo.

**CRICIÚMA**

**2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M392e Modolon, Henrique Borba.

Extração, secagem e aplicação do colágeno de peles de tilápia em membranas eletrofiadas para regeneração tecidual / Henrique Borba Modolon. - 2024.

96 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Criciúma, 2024.

Orientação: : Sabrina Arcaro.

Coorientação: Oscar Rubem Klegues Montedo.

1. Engenharia tecidual. 2. Cicatrização de feridas. 3. Curativos. 4. Tilápia (Peixe). 5. Pele de animais. 6. Colágeno. 7. Engenharia biomédica. I. Título.

CDD 23. ed. 610.28

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

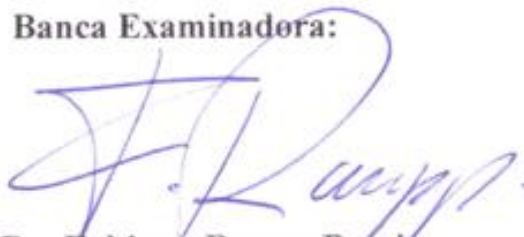
**Henrique Borba Modolon**

**EXTRAÇÃO, SECAGEM E APLICAÇÃO DO COLÁGENO DE PELES DE TILÁPIA  
EM MEMBRANAS ELETROFIADAS PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais na área de Tecnologia de Materiais no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - PPGCEM da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Criciúma, 27 de fevereiro de 2024.

**Banca Examinadora:**



**Prof. Dr. Fabiano Raupp Pereira**  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



**Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



**Prof. Dr. Marcia Adriana Tomaz Duarte**  
DBM/Eletrotech

Dedico esta dissertação a meus mentores, amigos e a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram a tornar esse trabalho uma realidade.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus profundos agradecimentos a todos aqueles de alguma forma me auxiliaram na elaboração dessa dissertação. Primeiramente a meu pai Edilson e minha mãe Eleusa, que sem o apoio e suporte deles nada disso seria possível.

A Sabrina Arcaro, minha professora, mentora, orientadora e acima de tudo amiga, por todas as orientações e conselhos, as noites sem dormir, ao apoio incansável e inabalável. Professora, muito obrigado pôr em momento algum desistir de mim.

Ao professor Oscar, que nunca me negou orientações e conselhos. Que me recebeu de braços abertos no laboratório, e me proporcionou toda a infraestrutura necessária para tornar esse trabalho uma realidade.

Aos professores Tiago, Fabiano e Paulo, pela parceria e os aconselhamentos que me salvaram nos mais diversos momentos.

A todos os integrantes do laboratório, mas em especial as minhas colegas Renata e Eduarda, por todas as risadas e momentos de descontração e apoio em meio ao caos, e toda a criatividade e inteligência que ambas possuem para transformar a minha bagunça em dados apresentáveis.

Aos meus amigos, aqueles que mesmo nos momentos mais difíceis arrancavam sinceras risadas, e de algum jeito me animavam a sair da cama. Aqueles que ficaram madrugadas a fundo comigo no Discord demonstrando sempre apoio e preocupação com a elaboração da minha dissertação. Amigos, posso dizer com franqueza que, sem vocês, esta dissertação não teria sido possível.

Por fim, agradeço à FAPESC e ao CNPq (Chamada Universal, T.O 406510/2023-7) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo, bem como à Universidade do Extremo Sul Catarinense e ao programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais pela infraestrutura disponibilizada. A todos que contribuíram de alguma forma, meu sincero agradecimento. Suas diversas formas de apoio foram indispensáveis ao longo desta jornada acadêmica.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, com que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

## RESUMO

A regeneração tecidual é um processo espacial e temporal síncrono, que pode ser otimizado com o uso de curativos funcionais. Entre eles, os curativos eletrofiados tem se destacado por mimetizarem a matriz extracelular (ECM), rica em colágeno. Considerando a importância desse componente, a integração de colágeno nos curativos se torna essencial. O colágeno pode ser extraído de diversas fontes, incluindo animais e vegetais, como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), sendo o Brasil um importante produtor dessa espécie. No entanto, produzir um curativo funcional eletrofiado somente com colágeno pode carecer de spinabilidade. Portanto, o poliácido láctico (PLA), que é um polímero derivado de fontes naturais e renováveis já extensamente usado na biomedicina com alta biocompatibilidade com o corpo humano, pode ser promissor para complementar essas propriedades. Estudos para a produção de curativos funcionais usando PLA e colágeno extraído da pele de tilápia ainda são escassos. Este estudo objetiva avaliar a extração de colágeno da pele de tilápia pelo método de solubilização ácida (ASC), e a confecção, pela primeira vez, de um curativo funcional de PLA e colágeno de pele de tilápia por eletrofiação, visando mimetizar a ECM. A caracterização do colágeno e das membranas foi realizado por meio de análises de pureza, rendimento, morfológicas, termogravimétrica (TGA), de citotoxicidade e migração celular. Foi possível extrair colágeno tipo I de alta pureza de pele de tilápia com rendimento de 0.51 a 13.95% com uma temperatura de desnaturação (Td) de 37 °C. A análise morfológica mostrou que o método de secagem interfere na integridade e propriedades do colágeno. Análises citotológicas revelaram que o colágeno apresentou boa viabilidade e migração celular. Nos curativos, a adição de colágeno evidenciou uma redução no diâmetro das fibras de 3,13 para 1,24  $\mu\text{m}$  e uma porosidade constante de 88%. Espectros de FTIR confirmaram a presença de colágeno nas fibras. Contudo, a adição de colágeno aumentou o ângulo de contato das membranas, de 97 para 116 °. Todas as membranas apresentaram viabilidade celular maiores que o controle. O teste de scratch revelou que as membranas auxiliam a migração celular com o fechamento mais rápido do arranhão. Os resultados indicam que o colágeno de pele de tilápia possui propriedades notáveis para aplicações biomédicas, enquanto as membranas demonstram potencial como curativos funcionais, acelerando o fechamento de feridas. No entanto, são necessários mais estudos in-vitro e in-vivo para validar sua eficácia clínica.

**Palavras-chave:** Tilápia; Colágeno; Eletrofiação; Curativos funcionais; Regeneração de feridas.

## ABSTRACT

Tissue regeneration is a synchronous spatial and temporal process, which can be optimized with the use of functional dressings. Among these, electrospun dressings have stood out because they mimic the extracellular matrix (ECM), which is rich in collagen. Considering the importance of this component, the integration of collagen into dressings becomes essential. Collagen can be extracted from various sources, including animals and plants, such as tilapia (*Oreochromis niloticus*), and Brazil is an important producer of this species. However, producing an electrospun functional dressing with collagen alone may lack spinnability. Therefore, poly(lactic acid) (PLA), which is a polymer derived from natural and renewable sources already widely used in biomedicine with high biocompatibility with the human body, may be promising to complement these properties. Studies into the production of functional dressings using PLA and collagen extracted from tilapia skin are still scarce. This study aims to evaluate the extraction of collagen from tilapia skin by the acid solubilization method (ASC), and the manufacture, for the first time, of a functional PLA and tilapia skin collagen dressing by electrospinning, with the aim of mimicking ECM. The collagen and membranes were characterized using purity, yield, morphological, thermogravimetric (TGA), cytotoxicity and cell migration analyses. It was possible to extract high purity type I collagen from tilapia skin with a yield of 0.51 to 13.95% at a denaturation temperature (Td) of 37 °C. Morphological analysis showed that the drying method interferes with the integrity and properties of the collagen. Cytotoxicological analysis revealed that the collagen showed good viability and cell migration. In the dressings, the addition of collagen showed a reduction in fiber diameter from 3.13 to 1.24  $\mu\text{m}$  and a constant porosity of 88%. FTIR spectra confirmed the presence of collagen in the fibers. However, the addition of collagen increased the contact angle of the membranes from 97 to 116°. All the membranes showed higher cell viability than the control. The scratch test revealed that the membranes aided cell migration by closing the scratch more quickly. The results indicate that tilapia skin collagen has remarkable properties for biomedical applications, while the membranes show potential as functional dressings, accelerating wound closure. However, further in-vitro and in-vivo studies are needed to validate their clinical efficacy.

**Keywords:** Tilapia; Collagen; Electrospinning; Functional dressings; Wound regeneration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação esquemática da pele e suas principais camadas.....	22
Figura 2 Representação de ferida fechada e ferida aberta. ....	24
Figura 3 Processo de regeneração de ferida aberta. ....	24
Figura 4 Representação de um curativo funcional obtido pelo processo de eletrofiação .....	28
Figura 5 Configuração esquemática de um equipamento de eletrofiação com coletor cilíndrico rotativo. ....	29
Figura 6 Representação esquemática das classificações dos biomateriais. ....	33
Figura 7 Policondensação direta e polimerização por abertura de anel do ácido láctico para obtenção de PLA.....	35
Figura 8 Implantes de PLA atualmente usados na ortopedia e na odontologia - Biotrak® pinos e parafusos. ....	36
Figura 9 Representação esquemática da molécula de colágeno. ....	37
Figura 10 Grupos de peixes mais produzidos em Santa Catarina, por piscicultores amadores e profissionais. Dados referentes a 2020. ....	42
Figura 11 Fluxograma geral do trabalho. ....	44
Figura 12 Representação esquemática da obtenção e purificação de colágeno pelo método ASC. ....	46
Figura 13 Métodos de secagem para o colágeno purificado. ....	47
Figura 14 Fluxograma esquemático das caracterizações do colágeno. ....	48
Figura 15. FTIR das amostras de colágeno liofilizadas. ....	56
Figura 16 Padrões de SDS-PAGE da amostra liofilizada. Faixa 1, marcador de peso molecular de proteína padrão; faixas 2-6 amostras de colágeno. ....	58
Figura 17 Superfície de contorno para rendimento. ....	61
Figura 18 Diagrama de Pareto para rendimento. ....	63
Figura 19 Análise térmica DSC/TG do colágeno liofilizado. ....	64
Figura 20 FTIR das amostras de colágeno secas por diferentes métodos, (a) estufa, (b) liofilizado e (c) dessecador.....	66
Figura 21 Imagem de MEV do colágeno seco na estufa (a) 5000x, (b) 10000x.....	67
Figura 22 Imagem de MEV do colágeno liofilizado (a) 5000x, (b) 10000x. ....	68
Figura 23 Imagem de MEV do colágeno seco no dessecador (a) 5000x, (b) 10000x. .....	69

Figura 24 Viabilidade celular dos colágenos liofilizados.....	70
Figura 25 Micrografias de Scratch nos tempos de 0, 24 e 48 h: (a) Controle, (b) colágeno.....	72
Figura 26 Micrografias das membranas, (a) PPuro, (b) P 9010, (c) P 8020, (d) PCol 9010 e (e) PCol 8020. Aumento de 1000x .....	73
Figura 27 Espectro de FTIR das membranas, onde, (a) P puro, (b) P 9010, (c) P 8020, (d) Pcol 9010 e (e) Pcol 8020.....	76
Figura 28 Ângulo de contato com água das membranas. ....	77
Figura 29 Viabilidade Celular das membranas.....	79
Figura 30 Micrografias de <i>Scratch</i> nos tempos de 0, 24 e 48 h: (a) Controle, (b) PPuro, (c) P 9010, (d) P 8020, (e) PCol 9010 e (f) PCol 8020. ....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Planejamento experimental .....	47
Tabela 2 Rendimento das amostras liofilizadas .....	58
Tabela 3 Análise de variância (ANOVA) para rendimento. ....	59
Tabela 4 Diâmetro de fio, densidade real, densidade aparente e porosidade das fibras. .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Colágeno solubilizado em ácido
ECM	Matriz extracelular
FDA	Food and Drug administration
HAP	Hidroxiapatita
HFP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização mundial da saúde
PAA	Ácido poliacrílico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Policaprolactona
PEG	Poli(etil)enoglicol
PGA	ácido poliglicólico
PLA	Poliácido láctico
PSC	Colágeno solubilizado com pepsina
PU	Poliuretano
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
TCP	Fosfato tricálcico
TFE	2,2,2-trifluoroetanol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1	PELE HUMANA .....	21
3.2	LESÕES EPITELIAIS.....	23
3.3	CURATIVOS .....	26
<b>3.3.1</b>	<b>Curativos sintéticos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Curativos funcionais</b> .....	<b>27</b>
3.4	ELETROFIAÇÃO .....	29
3.5	BIOMATERIAIS.....	31
3.6	POLIÁCIDO LÁCTICO .....	34
3.7	COLÁGENO.....	36
<b>3.7.1</b>	<b>Formas de extração de colágeno</b> .....	<b>39</b>
3.8	TILÁPIA NO BRASIL.....	40
<b>4</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>44</b>
4.1	COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA .....	45
<b>4.1.1</b>	<b>Extração do colágeno</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Isolamento e purificação do colágeno</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Planejamento experimental</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Caracterização do colágeno</b> .....	<b>48</b>
4.1.4.1	Pureza.....	48
4.1.4.2	Rendimento.....	48
4.1.4.3	Análise Morfológica: Microscopia Eletrônica de Varredura .....	49
4.1.4.4	Resposta Celular.....	49
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA ELETROFIAÇÃO .....	51
<b>4.2.1</b>	<b>Preparo das soluções de PLA</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Preparo das soluções de colágeno</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Preparo das soluções de PLA e colágeno</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Eletrofiação das membranas</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Caracterização das membranas</b> .....	<b>52</b>

4.2.5.1	Caracterização morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)..	52
4.2.5.2	Caracterizações físicas .....	52
4.2.5.3	Análise dos grupos funcionais presentes: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	54
4.2.5.4	Molhabilidade .....	54
4.2.5.5	Análise térmica.....	54
4.2.5.6	Resposta Celular.....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
5.1	EXTRAÇÃO DO COLÁGENO.....	55
<b>5.1.1</b>	<b>Influência das variáveis de extração na pureza e rendimento do colágeno .....</b>	<b>55</b>
5.1.1.1	Pureza do colágeno: FTIR e SDS .....	55
5.1.1.2	Rendimento.....	58
5.1.1.3	Análise estatística .....	59
<b>5.1.2</b>	<b>Influência da secagem nas características do colágeno.....</b>	<b>63</b>
5.1.2.1	Análise térmica (DSC/TG).....	63
5.1.2.2	Análise estrutural (FTIR) .....	65
5.1.2.3	Análise morfológica e microestrutural: MEV.....	66
<b>5.1.3</b>	<b>Avaliações integradas de resposta celular do colágeno.....</b>	<b>70</b>
5.1.3.1	Viabilidade Celular .....	70
5.1.3.2	Migração celular.....	71
5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS ELETROFIADAS COM COLÁGENO .....	72
<b>5.2.1</b>	<b>Influência da adição do colágeno extraído da pele de Tilápia em membranas eletrofiadas .....</b>	<b>73</b>
5.2.1.1	Caracterização morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)..	73
5.2.1.2	Análise estrutural: FTIR.....	75
5.2.1.3	Molhabilidade das membranas .....	77
<b>5.2.2</b>	<b>Avaliações integradas de resposta celular das membranas.....</b>	<b>78</b>
5.2.2.1	Viabilidade Celular .....	78
5.2.2.2	Migração celular.....	79
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A interação entre as células do corpo humano e as proteínas da matriz extracelular (ECM) desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, incluindo migração, proliferação e diferenciação (LAMERS et al., 2010). A ECM é composta por uma variedade de macromoléculas, incluindo proteínas fibrosas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas. Cada componente desempenha uma função específica na manutenção das atividades celulares. O colágeno se destaca como a proteína mais abundante neste sistema e é responsável por prover suporte estrutural para os tecidos (ZHANG; LIU; ZHANG, 2021).

O colágeno, componente essencial do corpo humano, destaca-se pela excelente biocompatibilidade com os tecidos do organismo. Além disso, proporciona suporte estrutural para a acomodação de células e favorece a reformação da ECM em locais previamente danificados, promovendo a regeneração tecidual. Vale ressaltar que o colágeno é de fácil acesso, amplamente disponível na natureza, biocompatível, não antigênico, não tóxico e biodegradável. Sua compatibilidade com outros polímeros, tanto naturais quanto sintéticos, e a maleabilidade em diversas formas ampliam suas possibilidades de aplicação. Além disso, o colágeno promove a coagulação sanguínea, é sinérgico com componentes bioativos e é biorreabsorvível (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

O colágeno de Tipo I pode ser extraído de diversas fontes, como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), sendo o estado de Santa Catarina o 4º maior produtor de tilápia do Brasil. A produção nacional cresceu muito e estudos de melhoramento genético estão tornando o cultivo do peixe cada vez mais comum e profissional (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2022). Das quase 50 mil toneladas produzidas no estado no ano de 2020, cerca de 70% é subproduto, que são as vísceras, cabeça, ossos, pele e escamas, que são um desafio para o setor pesqueiro, já que 50% do volume é sólido (GJERDE et al., 2012). Atualmente, boa parte desses subprodutos são subutilizados, sendo aproveitados apenas em compostagem, descartados em aterros, ou descartados inadequadamente no meio ambiente, ocasionando sérios problemas ambientais. Em alguns poucos casos, há aproveitamento para obtenção de ração (farinha de peixe), silagem e bio-óleo (MOTA; COSTA FILHO; BARRETO, 2019). O alto investimento em equipamentos e

instalações dos frigoríficos e a inexistência de equipamentos para pequenas produções não justifica a obtenção da farinha de peixe e seu baixo custo de venda. A silagem, por sua vez, apesar de poder ser utilizada como fertilizante, precisa de equipamentos especiais e mão de obra especializada que não viabiliza o custo final de venda do produto. Desta forma, ainda hoje, um dos métodos de disposição dos subprodutos sólidos mais aplicados pela agroindústria é a compostagem.

Do total de subprodutos da tilápia, 28 a 38% em massa corresponde ao esqueleto, 14 a 18% corresponde à cabeça, 3 a 4% de pele e 2 a 3% de escamas. Esses subprodutos são ricos em fosfatos de cálcio (hidroxiapatita) e colágeno, com características tão nobres que podem ser aproveitados em produtos de maior valor agregado a partir de formas rentáveis de valorizar o subproduto do peixe e dar mais valor a essa produção. O oeste paranaense, por exemplo, já exporta cerca de 30 ton por mês de pele e escamas de tilápia para a China (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2022) para a produção de colágeno.

As metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas para 2030, incluindo o ODS 2 (Fome zero e agricultura sustentável), ODS 12 (Cidades e comunidades sustentáveis) e ODS 14 (Vida na água), criaram um cenário de oportunidades para investir em processos sustentáveis, economia circular e, conseqüentemente, desenvolvimento de materiais e bioprodutos. Desta forma, a meta 2.3 do ODS 2 cita que “até 2030, deve-se dobrar a produtividade agrícola e a renda dos pequenos produtores de alimentos, [...] e pescadores, inclusive por meio de acesso seguro e igual à terra, outros recursos produtivos e insumos, conhecimento, serviços financeiros, mercados e oportunidades de agregação de valor e de emprego não agrícola”. Se esses bioprodutos puderem ser aplicados de acordo com o ODS 3 (saúde e bem-estar), pode ser ainda mais interessante, já que a meta 3.4 visa “até 2030, reduzir em um terço a mortalidade prematura por doenças não transmissíveis via prevenção e tratamento, e promover a saúde mental e o bem-estar”. Neste sentido, é importante pensar que quando um órgão no organismo sofre perdas de função decorrentes de doenças ou acidentes, faz-se necessário a substituição ou promover a cura da parte afetada para que sua função possa ser recuperada. O colágeno, é um polímero natural bioativo, biocompatível e biodegradável, que tem uma boa função de promover a formação de novos tecidos, tem função na concepção de órgãos e tem um papel fundamental na regeneração e reparo da pele (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Em suma, o colágeno pode ser obtido a partir da pele de peixe. O interesse em fontes de colágeno de não-mamíferos, principalmente de peixes, reside no fato de buscar uma fonte destes produtos a um custo menor e que possua as mesmas, e até melhores características estruturais e químicas em comparação as do corpo humano. Vale salientar que o colágeno sólido bovino chega a mais de R\$ 10000,00/g na Sigma Aldrich.

Nesse contexto, o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional porosa que contenha colágeno e atue como *scaffold* (arcabouço) pode desempenhar um papel importante na indução da reestruturação da matriz extracelular (ECM). A função do *scaffold* é replicar a arquitetura natural e as propriedades fisiológicas do tecido, fornecendo os nutrientes essenciais para a regeneração das áreas afetadas. Neste sentido, a integração de colágeno nestes *scaffolds* se torna essencial. Existem diversos métodos para a produção de *scaffolds*. Mas para a formação de fibras extremamente finas, porosas e com a possibilidade de adição de substâncias ativas, a eletrofiação (do inglês *electrospinning*) aparenta ser o mais indicado.

A eletrofiação é uma técnica eletro-hidrodinâmica utilizada para processar polímeros e produzir *scaffolds*. O princípio básico envolve a formação de uma gota a partir de uma solução polimérica, que é ejetada e eletrificada por meio de uma diferença de potencial até a formação de um fio contínuo. Esse fio é continuamente coletado, resultando na formação de uma membrana porosa e fibrosa (XUE et al., 2019). A técnica vem sendo extensamente estudada para a confecção de curativos funcionais. Tais curativos possuem alta porosidade, boas propriedades mecânicas e excelente biocompatibilidade. Isto resulta em um ambiente adequado capaz de promover e melhorar a regeneração do tecido danificado. Além disso a técnica permite a incorporação de materiais bioativos na confecção das fibras (CHEN et al., 2022).

Contudo, produzir um curativo funcional eletrofiado somente com colágeno pode carecer de *spinabilidade*. Neste sentido, o poliácido láctico (PLA) é um polímero derivado de fontes naturais e renováveis, de baixo custo, com alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e boas propriedades mecânicas. O PLA já é utilizado em diversas aplicações biomédicas, incluindo parafusos bioabsorvíveis, suturas, preenchedores dérmicos e sistemas de liberação de medicamentos (TYLER et al., 2016). No entanto, o PLA não possui grupos funcionais capazes de permitir ligações com as células, o que pode dificultar a adesão celular (LIU et al., 2021a).

Tanto o colágeno quanto o PLA são biomateriais aprovados pela *Food and Drug Administration* (CONN et al., 1995). Juntos possuem a potencialidade de formar um curativo funcional, o colágeno pode servir como um *scaffold* para ancoragem de células, fator crítico para a proliferação, migração e diferenciação celular (GAJBHIYE; WAIRKAR, 2022). Enquanto o PLA serve como suporte com função de melhorar a maleabilidade e a manuseabilidade do curativo.

Nesse sentido, é razoável considerar que a obtenção desse tipo de membrana de alto valor agregado pode representar um passo importante na valorização de resíduos agroindustriais. Para ilustrar, uma membrana comercial com dimensões de 13 mm x 25 mm pode chegar a custar R\$ 1200,00. Além disso, essa abordagem abre novas perspectivas para futuras pesquisas, visando a obtenção de materiais biocompatíveis a partir desses resíduos, promovendo, assim, uma abordagem mais sustentável e econômica na produção de biomateriais.

Nesse sentido, uma membrana contendo colágeno e PLA poderia combinar a capacidade de adesão celular do colágeno com as boas propriedades mecânicas do PLA. Estudos já demonstram a eficácia e a possibilidade da união de PLA e colágeno por meio da eletrofiação (CUI et al., 2015; RÂPĂ et al., 2020; TENG et al., 2008). Contudo poucos estudos indicam a fabricação de uma membrana funcional de colágeno extraído a partir de tilápia e de e PLA.

Desta forma, este trabalho almeja, pela primeira vez, a produção de uma membrana de colágeno para regeneração tecidual a partir de resíduos de tilápia. Para isso, inicialmente o colágeno foi extraído da pele de tilápia por meio do método de solubilização ácida (ASC) e, posteriormente, purificado. O colágeno foi caracterizado quanto à pureza, rendimento, morfologia, propriedades térmicas, citotoxicidade e capacidade de cicatrização de feridas. Após a obtenção do colágeno, foram preparadas soluções de PLA (poliácido láctico) e colágeno em diferentes concentrações para a eletrofiação das membranas. As membranas resultantes foram caracterizadas quanto à morfologia, densidade aparente, densidade real, densidade relativa, porosidade, grupos funcionais presentes, molhabilidade e resposta celular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é investigar o potencial das peles de tilápia como fonte de colágeno tipo I para a produção de membranas eletrofiadas, a fim de se obter propriedades adequadas para aplicação em regeneração tecidual.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos deste trabalho:

- Avaliar a influência das variáveis de extração na pureza e rendimento do colágeno;
- Investigar a influência dos métodos de secagem nas características do colágeno extraído;
- Avaliar os efeitos da adição de colágeno na morfologia e microestrutura das fibras, na porosidade e na molhabilidade das membranas produzidas;
- Avaliar a resposta celular das membranas produzidas, por meio de ensaios de citotoxicidade e migração celular contribuindo para a avaliação de sua eficácia na regeneração tecidual.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PELE HUMANA

A pele é o maior órgão do corpo humano, com uma área aproximada de 2 m<sup>2</sup>, a pele é responsável por diversas funções, como regular a homeostase e a temperatura corporal, e o sentido do toque (WANG et al., 2021). Além disso, a pele é a primeira barreira física do corpo humano contra agentes externos e está constantemente exposta ao meio ambiente, sendo, conseqüentemente, susceptível a diversos tipos de lesões (MURPHREE, 2017).

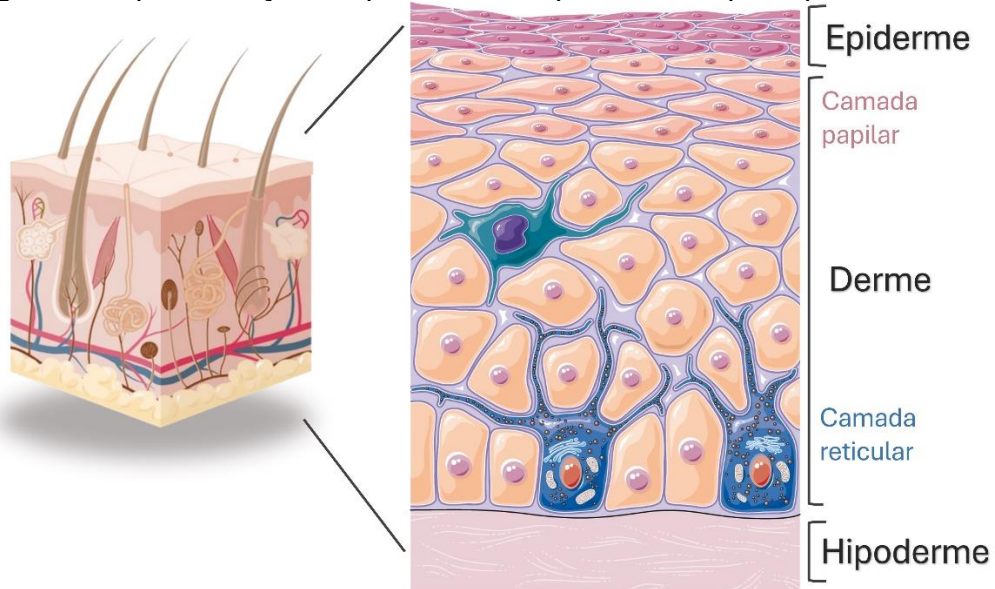
A pele é formada por 3 camadas distintas, a epiderme, a derme e a hipoderme ou camada subcutânea. Cada camada desempenha papéis específicos na proteção e na manutenção de propriedades específicas do corpo humano (LOPEZ-OJEDA et al., 2022).

A pele desempenha diversas funções essenciais. Além de fornecer proteção contra microrganismos, desidratação, luz ultravioleta, impactos e cortes, ela também atua na mediação das sensações de dor, calor, toque e pressão. Contribui para a mobilidade e elasticidade do corpo humano, iniciando processos endócrinos cruciais para a produção da vitamina D. A pele realiza atividades exócrinas, liberando água, ureia, amônia, sebo, suor e feromônios, além de secretar substâncias bioativas como as citocinas. Sua participação na regulação da temperatura corporal é fundamental, intervindo nos processos de conservação ou liberação de calor para manter o equilíbrio homeostático e a quantidade adequada de água no corpo (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

A Figura 1 ilustra as principais camadas que compõem a pele humana. A camada mais externa é denominada epiderme, seguida pela camada central conhecida como derme, enquanto a camada mais interna é chamada de hipoderme.

A epiderme constitui a camada mais externa da pele, desempenhando o papel de uma barreira física semipermeável. Essa camada representa a principal linha de defesa do corpo, sendo responsável por impedir a entrada de microrganismos invasores e regular a liberação de água do organismo. A epiderme é formada por 4 tipos distintos de células (LOPEZ-OJEDA et al., 2022; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2022):

Figura 1 Representação esquemática da pele e suas principais camadas.



Fonte: Do autor (2024).

(i) os queratinócitos, que são 95% do total de células da epiderme e são responsáveis pela produção de queratina, regulamentação da secreção de lipídios e tornando a pele semipermeável;

(ii) os melanócitos são células responsáveis pela produção de melanina, que dão coloração e tons as peles;

(iii) as células de Merkel são as responsáveis pelo sentido do tato; essas células estão ligadas a queratinócitos por desmossomos e contém filamentos intermediários de queratina. Suas membranas interagem com terminações nervosas livres na pele;

(iv) as células de Langerhans são responsáveis pela defesa do organismo contra invasores, pois tem a capacidade de realizar a fagocitose, que consiste no englobamento de micro-organismo para dentro da célula e a neutralização de sua função; além disso, as células de Langerhans são responsáveis pela ativação os linfócitos T, um grupo de glóbulos brancos responsáveis pela Apoptose (Autodestruição) de células invadidas por microrganismos ou defeituosas.

A derme é dividida em duas camadas de tecido conjuntivo distintos, a camada papilar e a camada reticular. A camada papilar é a camada superior com 300 a 400  $\mu\text{m}$  e fica em contato com a epiderme, a camada papilar possui terminações nervosas, vasos microvasculares, uma alta concentração de fibroblastos e de

proteoglicanos, e um baixo alinhamento das fibras de colágeno. A camada reticular é a camada abaixo da papilar, possui maior espessura e uma menor quantidade de células, na camada reticular se encontram densas fibras alinhadas de elastina e de colágeno, unidas as células por uma matriz extracelular (ECM) (LOPEZ-OJEDA et al., 2022; RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2022).

A ECM pode ser definida como uma rede complexa de macromoléculas. A interação entre células e essas proteínas desempenha um papel crucial na regulação direta e indireta de diversas atividades celulares, tais como migração, proliferação, diferenciação, expressão genética e secreção de proteínas. Com cerca de 300 proteínas, o colágeno representa a família predominante de proteínas fibrosas na matriz extracelular, desempenhando um papel fundamental na estrutura e elasticidade da pele (LU et al., 2011; SUN, 2021; ZHANG; LIU; ZHANG, 2021).

A hipoderme é a camada mais interna da pele. Possui uma alta concentração de adipócitos, células de gordura, que são responsáveis pela manutenção da temperatura corporal, a reserva energética e a absorção de impactos físicos. Além disso, a derme é a responsável pela conexão e a fixação de músculos e ossos à derme (LOPEZ-OJEDA et al., 2022).

### 3.2 LESÕES EPITELIAIS

Lesões podem ser caracterizadas por uma ruptura da camada epitelial e a integridade do tecido vivo, que pode causar anomalias na habilidade celular de proteção (SHRIVASTAV et al., 2018).

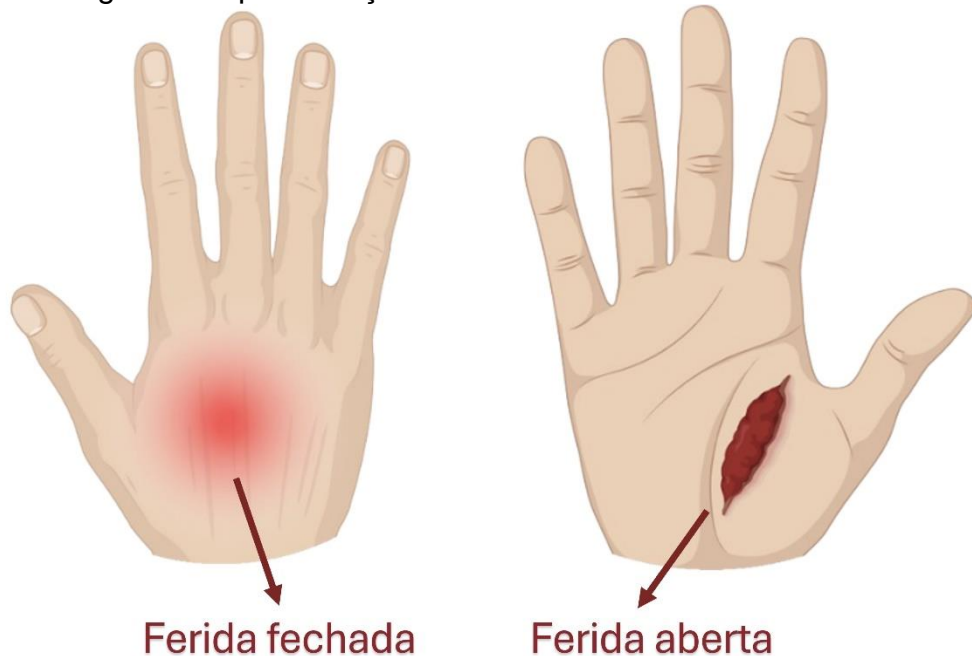
As feridas podem ser divididas em duas categorias principais: feridas abertas e feridas fechadas. A Figura 2 mostra exemplos de cada uma.

Feridas são caracterizadas como abertas quando sangue flui para fora do corpo e sangramento é visualmente observado, como incisões e cortes. Feridas são definidas como fechadas quando sangue escapa do sistema circulatório, mas, permanece abaixo da pele, como hematomas (SHRIVASTAV et al., 2018).

Quando a estrutura do tecido é danificada, seja por lesões, cirurgias, cortes ou queimaduras, inicia-se um processo natural de regeneração, que consiste em

diversas reações bioquímicas intra e extracelular com o objetivo final de restaurar a integridade e funcionalidade do tecido.

Figura 2 Representação de ferida fechada e ferida aberta.

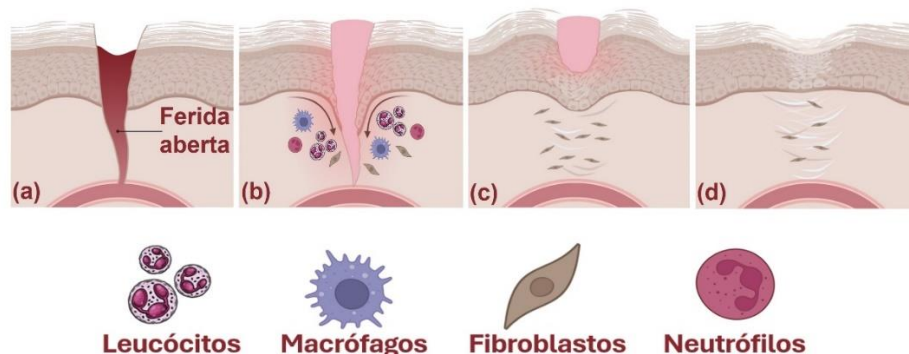


Fonte: Do autor (2024).

A regeneração de feridas é um dos processos mais complexos do corpo humano, já que este envolve a sincronização espacial e temporal da fase inflamatória com a regeneração e a remodelação do tecido (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

A Figura 3 ilustra os principais processos que a pele passa durante a sua regeneração natural, primeiramente ocorre a hemóstase (a), seguida de uma fase inflamatória (b) e, por fim, a remodelação e cicatrização (c) e (d).

Figura 3 Processo de regeneração de ferida aberta.



Fonte: Do autor (2024).

O tecido danificado passa então por um processo de hemóstase, com a vasoconstrição da área afetada, juntamente com o início de uma fase inflamatória, seguida por uma fase de proliferação celular, e reestruturação da matriz extracelular, e, por fim, ocorre a maturação e remodelagem do tecido (TOTTOLI et al., 2020).

A hemóstase ocorre de forma instantânea, as células endoteliais danificadas imediatamente iniciam a vasoconstrição, reduzindo o sangramento. As plaquetas são então acionadas e se dirigem à ferida, formando um coágulo. Além disso, as plaquetas liberam e sintetizam diversas proteínas, com o objetivo de estancar o sangramento, sincronamente ocorre a fase inflamatória (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A fase inflamatória é caracterizada como a resposta do organismo contra um agente patológico invasor. Nesta fase iniciam-se alterações imunológicas, bioquímicas e fisiológicas, que levam a um aumento do fluxo sanguíneo na região lesionada. Além disso, ocorre a ativação de mecanismos pró-inflamatórios, que por sua vez, atraem leucócitos, células especializadas na defesa e responsáveis pela destruição de microrganismos invasores. A fase inflamatória termina quando os microrganismos invasores e os mediadores forem secretados pelo organismo (SORG et al., 2017).

Após a destruição dos microrganismos invasores do local lesionado, inicia-se a migração de macrófagos, que realizam a limpeza e retirada de detritos, preparando o tecido para a fase de proliferação e reconstituição celular. Durante esta fase, o colágeno é produzido e ligado à fibronectina, dando início a reconstituição da matriz extracelular e a angiogênese, responsável pela nutrição e oxigenação dos novos tecidos (LIMA; PASSOS, 2021).

Por fim, o tecido passa por uma fase de remodelação e cicatrização, onde as células endoteliais e de defesa sofrem apoptose (morte celular programada), e dão espaço às células de tecido jovens e proteínas como o colágeno, reconstituindo a matriz extracelular e o tecido danificado (TOTTOLI et al., 2020).

Todos esses processos são desencadeados a fim de evitar a perda excessiva de sangue e fluidos, o desenvolvimento de infecções por agentes externos e facilitar a remoção de tecidos mortos.

### 3.3 CURATIVOS

Quando possui uma ferida aberta, a pele é exposta a microorganismos externos, capazes de gerar infecções. Logo, quanto maior o tempo de exposição da ferida com o ambiente, maior a chance de contaminação (ZHAO et al., 2016).

A regeneração de tecidos pode ser alcançada por meio de diferentes abordagens, que podem incluir tanto procedimentos cirúrgicos quanto não cirúrgicos. Geralmente, feridas cutâneas não requerem intervenção cirúrgica; sendo assim, são comumente tratadas com métodos não invasivos e de baixo custo, como o uso de gaze e algodão. No entanto, é importante observar que esses curativos tradicionais proporcionam uma oclusão limitada ao ambiente, permitindo a evaporação da umidade na área da ferida. Esse processo pode levar ao ressecamento da ferida, o que, por sua vez, prejudica o processo de regeneração tecidual (SAI K.; BABU, 2000).

Além disso, alguns tipos de curativos tradicionais são usados para absorver exsudados e fluidos de uma ferida aberta. Estes curativos requerem uma troca frequente, pois após a absorção do exsudado e outros fluidos, eles se tornam úmidos e carregados de células e microorganismos mortos. Desta forma, perdem a função de manter o ambiente favorável para a regeneração tecidual. Ademais, a troca constante de curativos gera incômodos e dor para o paciente (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Até os anos 60, os curativos eram apenas considerados como agentes passivos com uma interação mínima com o processo de regeneração tecidual. Isso mudou quando Winter *et al.* (1962) desenvolveram o conceito de curativos capazes de criar um ambiente favorável para auxiliar na regeneração tecidual (LIU et al., 2018).

Os curativos modernos podem ser categorizados com base em diversos fatores. Estes incluem a criação e manutenção de um ambiente úmido, a proteção da ferida contra infecções secundárias, como uma barreira eficaz contra bactérias, a facilitação da troca gasosa adequada, a manutenção da temperatura ideal enquanto protege contra partículas e contaminantes tóxicos e o gerenciamento do excesso de exsudato para uma troca de curativo sem traumas, além de serem elásticos e não antigênicos (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

De acordo com a natureza de seus materiais constituintes, os curativos podem ser divididos em duas categorias: sintéticos ou biológicos. Além disso, podem

ser subclassificados como primários (aqueles que estão em contato físico com o local da ferida), secundários (aqueles que cobrem os curativos primários) ou curativos ilha (um curativo composto por uma parte central absorvente, cercado por uma parte adesiva) (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

### 3.3.1 Curativos sintéticos

Curativos sintéticos são uma classe de curativos derivados de materiais sintéticos. Podem ser classificados como filmes, espumas ou *sprays*, hidrocoloides, hidrogéis ou de alginato.

Curativos de filmes sintéticos são constituídos de polímeros naturais ou sintéticos, incluindo álcool polivinílico (PVA), ácido poliacrílico (PAA), policaprolactona (PCL), polietileno glicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) e ácido polilático (PLA). Estes polímeros usualmente possuem boas propriedades mecânicas e boa trabalhabilidade. Todavia não possuem boa aderência além de possuírem baixa absorção de fluidos e exudado e baixa permeabilidade (SAVENCU et al., 2021).

Espumas ou *sprays* são uma classe de curativos leves, com boa permeabilidade de gases, não aderentes e confortáveis. Podem ser obtidos a partir de diversos polímeros sintéticos, como álcool polivinílico (PVA) e poliuretano (PU), ou de polímeros naturais como gelatina. Este tipo de curativo é portátil, e de fácil uso; contudo, são difíceis de manter em áreas de muito contato ou movimento (NEUMANN; ZUR; EHRENREICH, 1981).

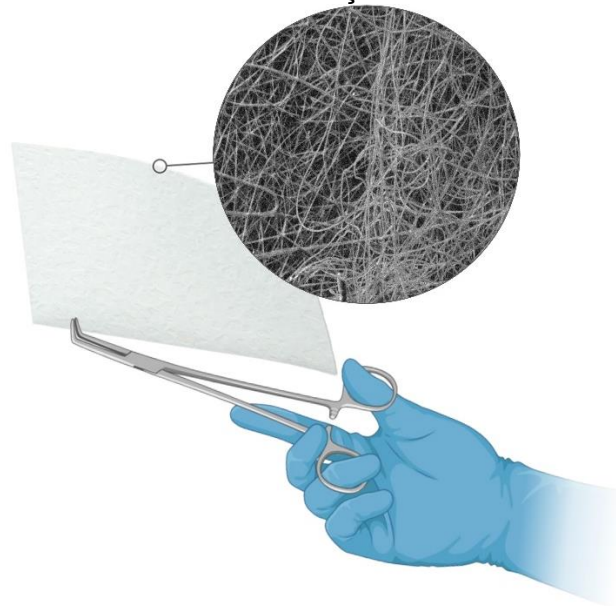
Os hidrogéis, por sua vez, têm a capacidade de estabelecer uma barreira semioclusiva, criando um ambiente úmido e respirável que impede o ressecamento da ferida. Além disso, a alta umidade possibilita trocas benéficas com o local da ferida, absorvendo exsudado e liberando umidade. No entanto, é importante notar que a viscosidade do gel pode representar um desafio em termos de manuseio do curativo (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

### 3.3.2 Curativos funcionais

Curativos funcionais fazem parte de um grupo emergente de curativos com propriedades que vão além dos curativos tradicionais e biológicos. São curativos que

interagem funcionalmente com o leito da ferida em suas diferentes fases de reparo. Os curativos funcionais buscam unir as propriedades dos curativos sintéticos com os curativos biológicos. Estes curativos podem ser feitos de vários polímeros derivados de fontes naturais, como gelatina, quitosana, alginato e colágeno. Além disso, esses curativos podem ser carregados com diferentes fármacos, nanopartículas e materiais bioativos (LIU et al., 2021). Com relação ao processamento, os avanços mais recentes na área concentram-se no desenvolvimento de curativos na forma de hidrogéis, ou membranas produzidas pela técnica de "*casting*" ou evaporação de solvente, ou ainda pelo método de eletrofiação (ALVEN et al., 2022; CHEN et al., 2022; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; HERNÁNDEZ-RANGEL; MARTIN-MARTINEZ, 2021; LIMA; PASSOS, 2021). A Figura 4 ilustra um exemplo de curativo funcional.

Figura 4 Representação de um curativo funcional obtido pelo processo de eletrofiação



Fonte: Do autor (2024).

Curativos eletrofiados vem ganhando cada vez mais destaque na área de regeneração tecidual, devido às vantagens como morfologia ajustável, propriedades mecânicas que simulam a matriz extracelular, permeação de gases, molhabilidade ajustável, facilidade de empregar diversos tipos de polímeros sintéticos e naturais, além de *blends* desses polímeros, exercendo papel fundamental na regulação da adesão, proliferação, diferenciação e migração celular, além de atuar como

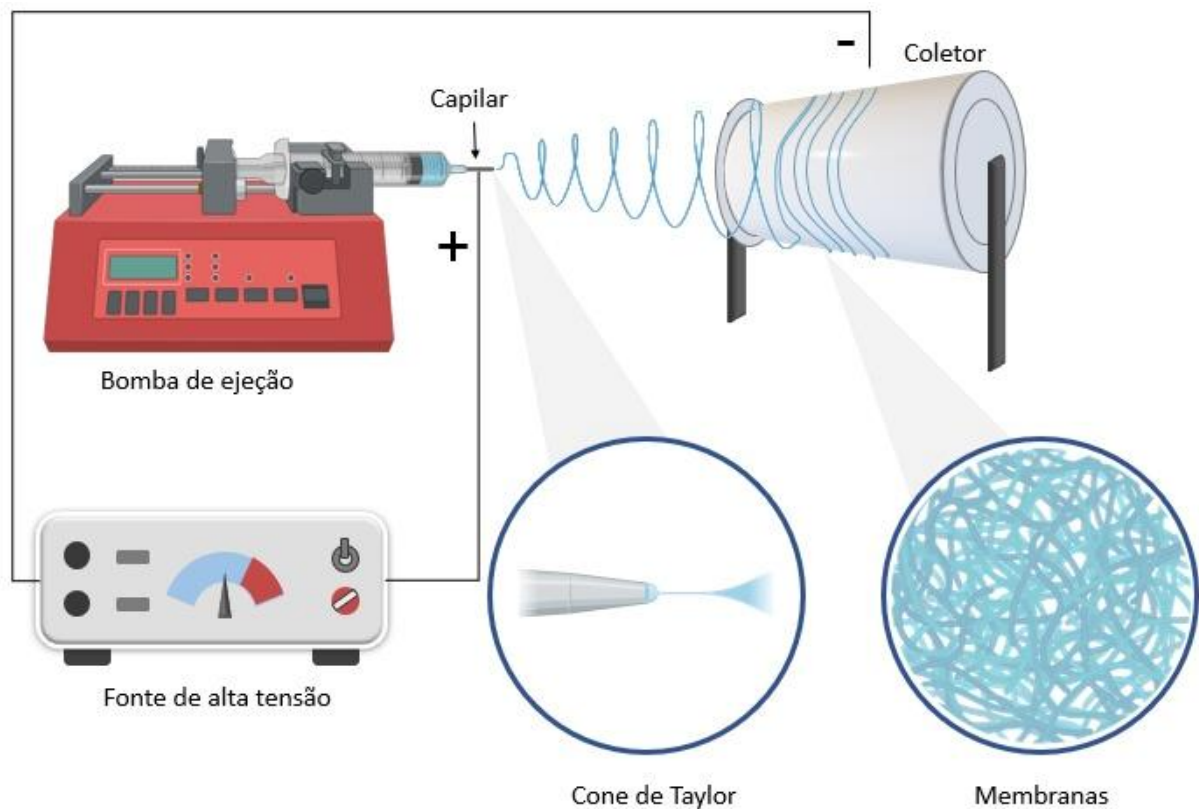
dispositivos de entrega de fármacos, favorecendo processos regenerativos (ALVEN et al., 2022; CHEN et al., 2022).

### 3.4 ELETROFIAÇÃO

O processo de eletrofiação, ou *electrospinning*, consiste na produção de fibras ultrafinas a partir de soluções poliméricas, por meio da aplicação de um campo elétrico. Essas fibras possuem diâmetros de micrométricos a nanométricos e apresentam uma alta relação superfície-volume, o que as torna ideais para diversas aplicações biomédicas. Ao final de um processo eletro-hidrodinâmico, as fibras contínuas e emaranhadas formam um tecido muito fino e poroso (POWELL; BOYCE, 2009).

A Figura 5 ilustra a configuração básica de um equipamento de *electrospinning*.

Figura 5 Configuração esquemática de um equipamento de eletrofiação com coletor cilíndrico rotativo.



Fonte: Do autor (2024).

A configuração do equipamento é relativamente simples e inclui uma fonte de alta tensão, uma seringa com bombeamento automático, uma agulha e um coletor (LAW et al., 2017a). Uma solução polimérica é extrudada para a ponta da agulha e uma pequena gota se forma. Com o aumento da tensão gerada pela fonte, essa gota sofre um alongamento até adquirir um formato cônico, conhecido como cone de Taylor, que permanece até que a carga na superfície da gota ultrapasse a tensão superficial da solução polimérica. Assim, forma-se o primeiro fio. O solvente evapora durante a viagem até o coletor e esse processo se repete inúmeras vezes, até que se formem vários fios na saída da agulha. A formação da fibra é resultante das forças geradas pelo campo eletroestático gerado pela diferença de potencial entre o coletor e a ponta da agulha (LI; SHANTI; TUAN, 2006).

As variáveis deste processo dependem de diversos fatores, tais como: disposição da agulha (vertical ou horizontal), distância entre a agulha e o coletor, vazão da solução e voltagem aplicada. Quanto à solução, as variáveis principais são tensão superficial, condutividade, peso molecular do polímero, viscosidade, momento dipolo e constante dielétrica; além disso, há fatores inerentes do ambiente, como temperatura e umidade relativa do ar (MERCANTE; CORRÊA, 2023).

Cada variável é responsável por mudanças no diâmetro do fio e características finais da membrana. Para soluções com materiais condutores, a distância entre a agulha e o coletor é um fator a ser considerado. Usualmente, soluções condutoras não conseguem formar fios devido à atração elétrica ser muito alta. Desta forma, a diminuição da distância, juntamente com uma diminuição na tensão, pode ser um fator a ser considerado. A vazão é responsável diretamente pela quantidade de material disponível por tempo para eletrofiação, então quanto menos material disponível na saída da agulha, menor o diâmetro de fio. Por outro lado, a diminuição excessiva da vazão leva à secagem do polímero na saída da agulha e ao entupimento da agulha, não permitindo que o polímero viaje até o coletor. Já a tensão tem um papel similar da bomba de vazão: o aumento da tensão provoca um afinamento do fio e, conseqüentemente, uma maior velocidade do fio. Já para fios mais espessos, a diminuição da tensão, juntamente com o aumento da vazão da bomba, é aconselhada (HOSSEINI RAVANDI et al., 2022).

A principal vantagem da eletrofiação é sua capacidade de produzir fibras a partir de uma ampla variedade de polímeros, incluindo polímeros biocompatíveis,

como poli(ácido láctico), poli(caprolactona) e poli(hidroxiacetato). A seleção do polímero deve ser realizada de acordo com a área de aplicação e as propriedades de membrana que se deseja obter. Desta forma, esses polímeros ganham espaço em aplicações biomédicas, como na engenharia tecidual (LAW et al., 2017b), na produção de curativos (HERNÁNDEZ-RANGEL; MARTIN-MARTINEZ, 2021) e liberação controlada de fármacos (HUO et al., 2021).

As fibras derivadas da eletrofiação podem ser consideradas curativos de alta performance devido à sua alta porosidade e permeabilidade. Essas características permitem que o curativo forneça barreiras eficazes contra micro-organismos patogênicos externos (ZHANG et al., 2024).

Para curativos funcionais, a disposição das fibras desempenha um papel crucial, uma vez que as células têm uma preferência por superfícies que se assemelham à matriz extracelular (SOMAIHAH et al., 2015). A técnica de eletrofiação permite a manipulação do direcionamento das fibras, facilitando a adesão de novas células ao curativo, atuando como *scaffold* para o crescimento e proliferação celular (GU et al., 2023). Além disso, a eletrofiação permite a incorporação de fármacos e agentes bioativos nas fibras, ampliando ainda mais as possíveis aplicações. Proteínas, células-tronco e até mesmo DNA podem ser integrados na solução polimérica, oferecendo uma variedade de funções que as membranas podem assumir (STOJANOV; BERLEC, 2020).

### 3.5 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são de extrema importância para o desenvolvimento e aprimoramento da medicina, sempre buscando soluções para doenças e traumas físicos que uma pessoa pode vir a sofrer ao longo da vida. São materiais que interagem com sistemas biológicos, desde moléculas individuais até tecidos e órgãos inteiros. Eles são usados para substituir, reparar ou regenerar tecidos e órgãos, ou para fins de diagnóstico e monitoramento. Em suma, biomaterial pode ser definido como um material projetado para assumir uma forma que pode direcionar, por meio de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico (ZHANG; WILLIAMS, 2019).

De acordo com Zhang e Williams (2019), os biomateriais são divididos em 4 grandes grupos, dependendo das reações biológicas que podem causar no organismo: biotoleráveis, bioinertes, bioabsorvíveis e bioativos:

- Biotoleráveis são uma classe de materiais que liberam íons, materiais corrosivos e/ou químicos no corpo. O portador tende a criar uma camada fibrosa adjacente à região onde o material está em contato, formando uma película protetora. A espessura da película indica a tolerabilidade do corpo com o material: quanto mais espessa, menos biotolerável é o material. Praticamente todos os polímeros sintéticos e a maioria dos metais se encaixam nessa categoria;

- Bioinertes são materiais que praticamente não demonstram uma resposta biológica com o tecido conjuntivo, ou seja, são materiais inertes e estáveis dentro do corpo. A película ainda é gerada, porém é praticamente inexistente. Estes materiais possuem alta resistência à corrosão e usualmente são usados como suporte para enxertos em ossos e cartilagens; alguns exemplos são a zircônia e a alumina;

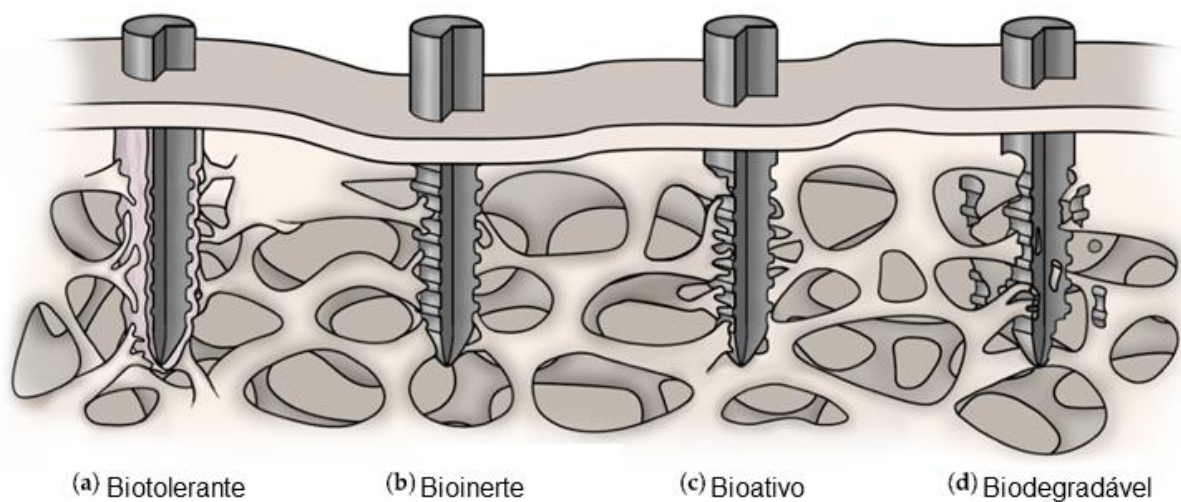
- Bioabsorvíveis são materiais capazes de liberar, de forma gradual e controlada, íons benéficos para a regeneração da estrutura celular. Ao final do processo de recuperação, o material será totalmente absorvido pelo corpo, não deixando qualquer rastro; como exemplo, tem-se o fosfato tricálcico (TCP);

- Bioativos apresentam propriedades capazes de estimular uma resposta biológica da célula ou tecido. Esta classe de biomateriais abrange biomateriais com capacidades de prover recursos vitais para a função que foram designados e tem propriedades como estimular a diferenciação e a proliferação celular, estimular a regeneração de tecidos e liberar compostos bioativos capazes de auxiliar no processo natural de regeneração e reparo de tecidos do corpo humano. Bioativos cerâmicos são usualmente usados como revestimento de materiais bioinertes, provendo, assim, uma ligação do material com o tecido conjuntivo. Além disso, cerâmicas bioativas podem possuir uma propriedade de osteocondutividade, facilitando a regeneração do tecido ósseo. Esses materiais têm potencial de regeneração óssea; como exemplo, tem-se os vitrocerâmicos e os vidros bioativos, a hidroxiapatita e o colágeno.

A Figura 6 mostra a representação esquemática dos quatro possíveis tipos de biomateriais. Da esquerda para a direita, é possível observar um material biotolerante (a), em que é visível a espessa camada que se formou nas extremidades do implante e a ligação do tecido conjuntivo se dá pela camada formada, sem contato

com o material biotolerante. O bioinerte (b) não apresenta nenhuma forma de rejeição e nem a liberação de íons nocivos ao portador; todavia, apresenta baixíssima afinidade com o tecido conjuntivo. O bioativo (c), por sua vez, possui alta afinidade com o tecido conjuntivo, fazendo uma ligação química forte, podendo prover íons que auxiliam na regeneração do local implantado. Por fim, o biodegradável (d) forma uma ligação de caráter químico, fornece íons que auxiliam na regeneração do tecido e, por fim, o material será todo consumido e desaparecerá do corpo.

Figura 6 Representação esquemática das classificações dos biomateriais.



Fonte: Ødegaard, Torgersen e Elverum (2020).

Os biomateriais são usados em uma ampla variedade de aplicações médicas, incluindo implantes ortopédicos, dispositivos de engenharia tecidual, sistemas de entrega de medicamentos e diagnóstico por imagem. Eles podem ser produzidos de uma ampla variedade de materiais, incluindo metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Cada material tem suas próprias propriedades físicas e químicas únicas, que influenciam sua interação com o ambiente biológico. São projetados para serem biocompatíveis, ou seja, para não provocarem uma resposta imunológica do hospedeiro e para se integrarem com sucesso aos tecidos circundantes (RATNER, 2013). Eles também devem ser capazes de suportar as cargas e forças mecânicas do ambiente biológico. Além disso, os biomateriais também precisam ser capazes de resistir à degradação e corrosão no ambiente biológico.

A escolha do biomaterial mais adequado depende da aplicação específica e dos requisitos de desempenho. Por exemplo, os implantes ortopédicos geralmente

são feitos de metais ou cerâmicas resistentes, enquanto os hidrogéis são frequentemente usados para a engenharia tecidual e sistemas de entrega de medicamentos. Recentemente, materiais biodegradáveis e biocompatíveis, como o poliácido láctico (PLA) o ácido poliglicólico (PGA) e a policaprolactona (PCL) têm ganhado popularidade, devido à sua capacidade de se degradarem no corpo e serem eventualmente reabsorvidos pelo corpo (LANGER; TIRRELL, 2004). Em suma, cada biomaterial desempenha um papel crucial na regeneração tecidual.

A pesquisa em biomateriais está em constante evolução, com a introdução de novos materiais e técnicas de fabricação. Os avanços recentes incluem a engenharia tecidual e a terapia genética, que usam biomateriais para cultivar tecidos e órgãos em laboratório para uso em transplantes e terapias regenerativas (NAKAYAMA, 2013).

### 3.6 POLIÁCIDO LÁCTICO

O poliácido láctico (PLA) é um polímero termoplástico derivado de fontes renováveis como a cana de açúcar, o amido de milho e de outras biomassas. O PLA é um biopolímero produzido mundialmente em larga escala. A produção e uso do PLA se destaca dos outros polímeros sintéticos por diversos fatores como: a sua síntese pode consumir dióxido de carbono, é compostável e reciclável e possui consumo energético menor em comparação com polímeros derivados do petróleo (DE OLIVEIRA; BORGES, 2020).

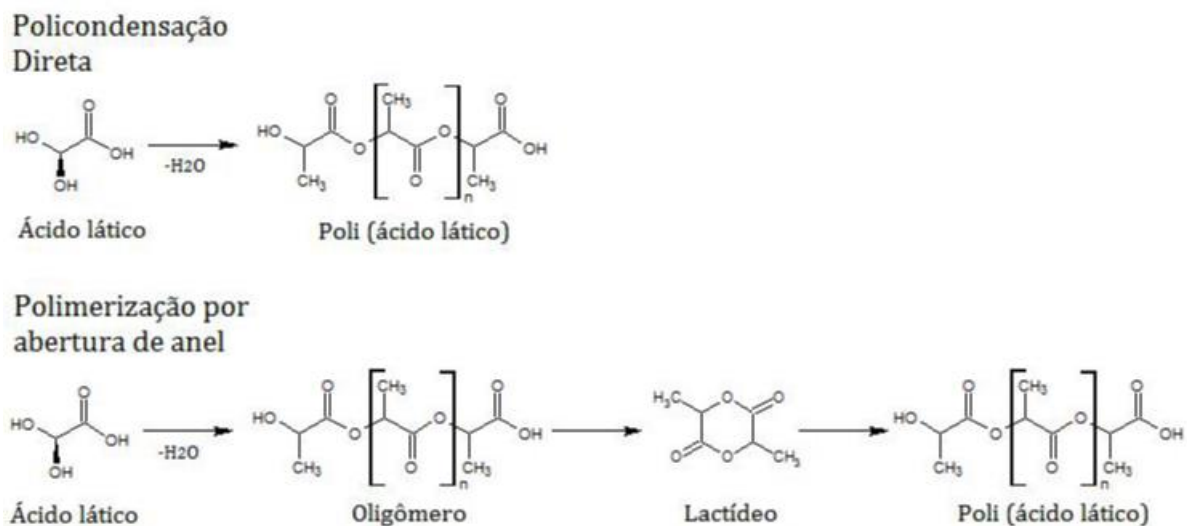
O precursor do PLA é o ácido láctico e a polimerização deste monômero usualmente ocorre por dois distintos processos, ou por meio da policondensação direta ou polimerização por abertura de anel.

A policondensação é o método que requer menor custo operacional, mas ao final do processo gera um PLA de baixo peso molecular. Já a polimerização por abertura de anel gera um PLA com peso molecular maior e o crescimento da cadeia pode ser controlado, mas é um processo mais complexo e de maior custo (SLOMKOWSKI; PENCZEK; DUDA, 2014).

A Figura 7 ilustra os dois meios principais de polimerização do ácido láctico em PLA.

A busca de um futuro sustentável é o alvo de diversos órgãos governamentais. A Europa, por exemplo, por meio da diretiva de fim de vida de veículos (ELVs) e da diretiva de embalagens e resíduos de embalagens, busca assegurar, até 2050, uma economia limpa e circular com impacto neutro no clima (COMMISSION et al., 2018). O objetivo deve ser alcançado por meio da reciclagem e de uso de polímeros de fontes renováveis, promovendo assim a economia circular. O PLA se encaixa nessas condições.

Figura 7 Policondensação direta e polimerização por abertura de anel do ácido láctico para obtenção de PLA.



Fonte: Horban *et al.* (2017).

Muitas indústrias já vêm investindo no uso de PLA em suas aplicações, como as de embalagens, tecidos, automobilística e de construção civil, especialmente devido à sua rápida degradação hidrolítica e à diversidade de processamentos e obtenção de blendas (DOMENEK; COURGNEAU; DUCRUET, 2011).

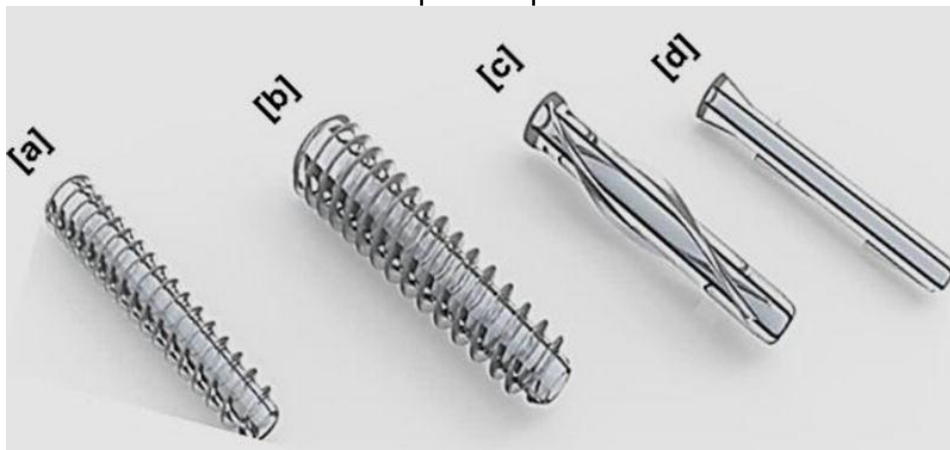
Contudo, o uso chave do PLA está nas aplicações como um biomaterial; o PLA já um polímero consolidado na indústria biomédica e é um polímero bioabsorvível.

A Figura 8 ilustra alguns tipos de implantes de PLA, sendo [a] mini parafuso usado na fixação de defeitos osteocondrais (danos ou lesões na cartilagem e no osso subjacente), em pé, tornozelo e mão; [b] parafuso padrão usado no tratamento de defeitos osteocondrais, em osteotomias (cirurgia que requer o corte de um osso para corrigir deformidades ósseas, realinhar articulações ou corrigir problemas estruturais);

[c] parafuso utilizado na fixação de fraturas no braço; e [d] pino usado para tratar defeitos no antebraço (NARAYANAN et al., 2016).

As aplicações do PLA não se limitam somente a implantes; pode também ser usado como um *scaffold* para *drug delivery*, ou ainda como fibra ou filme para regeneração tecidual (CHEN et al., 2023). Fibras de PLA fabricadas pelo processo de eletrofição podem ser carregadas com fármacos ou proteínas, fator que pode reduzir o tempo de regeneração de feridas, além de auxiliar na angiogênese do tecido. Diversos estudos já demonstram a possibilidade de incorporação de fármacos e proteínas em fibras eletrofiadas de PLA e os resultados se demonstram promissores (BI et al., 2020a; FATTAHI; KHODDAMI; AVINC, 2020; HERRERO-HERRERO et al., 2021b; RÂPĂ et al., 2020).

Figura 8 Implantes de PLA atualmente usados na ortopedia e na odontologia - Biotrak® pinos e parafusos.



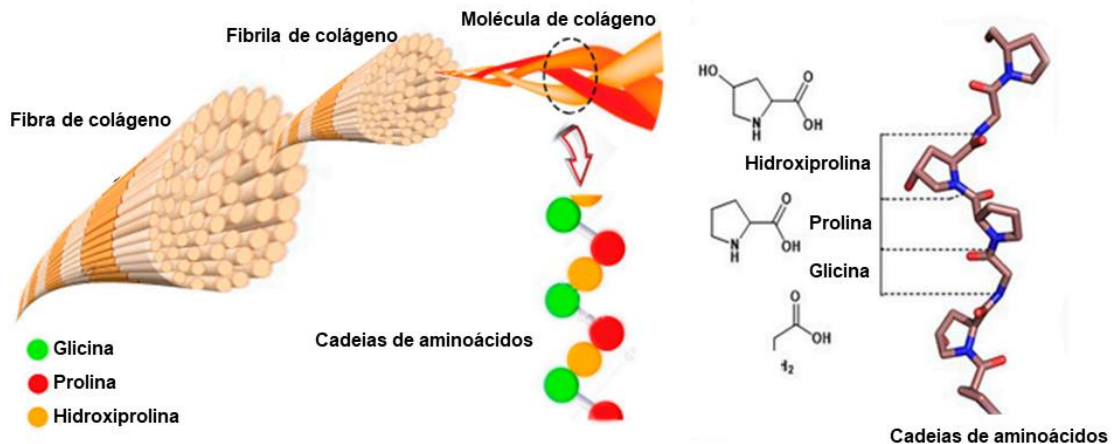
Fonte: Narayanan et al. (2016).

### 3.7 COLÁGENO

O colágeno (Figura 9) é uma família de proteínas fibrosas de maior quantidade na matriz extracelular (ZEUGOLIS et al., 2008).

Consiste em, aproximadamente, 20 a 30% da quantidade total de proteínas no corpo e exerce um papel fundamental na regulamentação celular, além de prover suporte estrutural para órgãos e tecidos. Está presente em tecidos como pele, tendões, ossos e cartilagem.

Figura 9 Representação esquemática da molécula de colágeno.



Fonte: Jafari *et al.* (2020).

Atualmente, já foram identificados 28 tipos de colágeno e 46 tipos de cadeias de polipeptídios. As cadeias são compostas por uma tripla hélice característica, formadas por Glicina-X-Y em repetição, onde X e Y são aminoácidos residuais, como prolina e hidroxiprolina (GHOMI *et al.*, 2021).

O colágeno desempenha um papel importante na estrutura e resistência dos tecidos em que está presente e é o que o torna um biomaterial amplamente utilizado na medicina regenerativa.

A extração de colágeno tipo I pode ser realizada a partir de várias fontes, sendo os animais as fontes mais usuais, como por exemplo, os bovinos (DE CAMPOS VIDAL, 2007), os suínos (MAURER *et al.*, 2018), os frangos (OECHSLE *et al.*, 2016) e os peixes (FELICIAN *et al.*, 2018). O colágeno é insolúvel em água e, em algumas aplicações, seu uso requer a desnaturação da estrutura proteica. O processo de extração geralmente envolve a remoção de lipídios e outras impurezas, seguido por tratamento com ácidos ou enzimas para quebrar as ligações cruzadas de colágeno e liberar as fibrilas de colágeno.

A escolha do método é baseada nas características finais desejadas do produto (JAFARI *et al.*, 2020). Os processos, em geral, consistem em lavagem e limpeza, seguido de um pré-tratamento químico para remover substâncias não colagenosas da amostra.

A distinção do colágeno de outros polímeros naturais, ou de seus análogos, os polímeros sintéticos, se encontra, principalmente, na forma como o colágeno se comporta dentro do corpo (MCPHERSON; SAWAMURA; ARMSTRONG, 1986). A

razão da utilização de colágeno na área biomédica se dá por conta das fibras com interessantes propriedades mecânicas e altamente estáveis, pela sua auto-agregação e ligações cruzadas. Além disso, a fonte natural a partir da qual o colágeno foi extraído influencia nas características que apresenta: colágenos de fonte animal apresentam melhor biocompatibilidade com o corpo humano (LEE; SINGLA; LEE, 2001). O colágeno tipo I extraído pode ser utilizado como biomaterial em diferentes apresentações, como hidrogéis, filmes, fibras e esponjas. Em aplicações de engenharia de tecidos, o colágeno tipo I é frequentemente usado como matriz para regeneração de tecidos, proporcionando um ambiente tridimensional favorável para a adesão, proliferação e diferenciação de células.

O colágeno tipo I também é um componente comum em produtos comerciais, como curativos para feridas e preenchimentos dérmicos. Sua capacidade de promover a regeneração tecidual e interação com células tornam-no um material atraente para essas aplicações. Também tem sido estudado para outras aplicações biomédicas, como suporte para liberação controlada de drogas e terapias de engenharia de tecidos para doenças como osteoartrite e doenças cardiovasculares (GAJBHIYE; WAIRKAR, 2022).

Vários trabalhos já demonstram a capacidade de eletrofiação de colágeno tipo I, contudo sua solubilização é complexa e solventes fluorados precisam ser utilizados como 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) e 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), mas misturas de ácido acético com dimetilsulfóxido (DMSO) também já foram utilizadas. Além disso, as fibras de colágeno não possuem boas propriedades mecânicas, não possuem boa espinabilidade (capacidade de formação de fibras por eletrofiação), fator que dificulta seu uso como um curativo. A união de colágeno com outros polímeros sintéticos tem como objetivo melhorar a sua manuseabilidade sem perder suas propriedades bioativas, como a habilidade de estimular a migração, diferenciação e proliferação celular, tão importantes para a regeneração de tecidos (GHOMI et al., 2021; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010; POWELL; BOYCE, 2009).

### 3.7.1 Formas de extração de colágeno

O colágeno pode ser obtido de várias fontes animais. As mais comuns são bovinas e porcinas; contudo, colágeno derivado de fontes aquáticas vem ganhando notoriedade, especialmente pelo fato de possuírem um alto conteúdo proteico, sem conflitos étnicos e de religião, menor quantidade de toxinas biológicas presentes, menor imunogenicidade, baixa resposta inflamatória e são adequados para metabolização (AHMED; VERMA; PATEL, 2020).

Os métodos mais comuns para extração de colágeno de fontes aquáticas são os métodos ASC (colágeno solubilizado em ácido) e PSC (colágeno solubilizado com pepsina). A diferença principal entre estes dois métodos está no fato de o método PSC utilizar de pepsinas que quebram as ligações intermoleculares nas regiões telopeptídicas do colágeno, o que pode aumentar o rendimento do colágeno. Contudo, esses resultados não são constantes. Além disso, o método das pepsinas pode induzir à fragmentação da estrutura do colágeno, o que resulta em uma molécula com menor peso molecular e menor temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) (CAO et al., 2022; DUAN et al., 2009).

A extração de colágeno é composta principalmente por 2 passos-chave do processo: primeiramente, um pré-tratamento e limpeza de impurezas do material e, posteriormente, a extração do colágeno em si. O pré-tratamento usualmente consiste na limpeza de resíduos, na retirada da gordura do tecido, a solubilização de proteínas em um meio básico e, por fim, a solubilização do colágeno em um meio ácido (MONG et al., 2021).

A limpeza do material deve ser realizada a fim de eliminar resíduos que não são de interesse como materiais carnosos, pelos e escamas. Depois, deve se remover a gordura do tecido, usualmente com o uso de álcoois, como o butílico ou etanoico. Em seguida, para retirar outras proteínas que não são de interesse e pigmentos, se faz uma primeira extração usualmente com NaOH; contudo, outros sais podem ser usados, como NaCl ou NaHCO<sub>3</sub> (XU et al., 2017). Por último, se faz a extração do colágeno com a adição de um ácido como acético, láctico e cítrico (OSLAN et al., 2022).

Cada tipo de animal possui diferentes proteínas que não são de interesse na extração de colágeno; desta forma o pré-tratamento pode variar para o mesmo animal, por exemplo, para a extração ácida de colágeno da pele da tilápia, não é

necessário a descalcificação da pele; todavia, é um passo de extrema importância para a obtenção de colágeno das escamas e das espinhas.

A estabilidade térmica é um fator crucial para o colágeno, já que a desnaturação causa o desdobramento da tripla hélice, o que leva à perda da sua função (BISCHOF; HE, 2006). Já o peso molecular, modifica as propriedades da solução para a eletrofiação: polímeros com maiores pesos moleculares necessitam de uma menor concentração para iniciar a formação de fios (KOSKI; YIM; SHIVKUMAR, 2004).

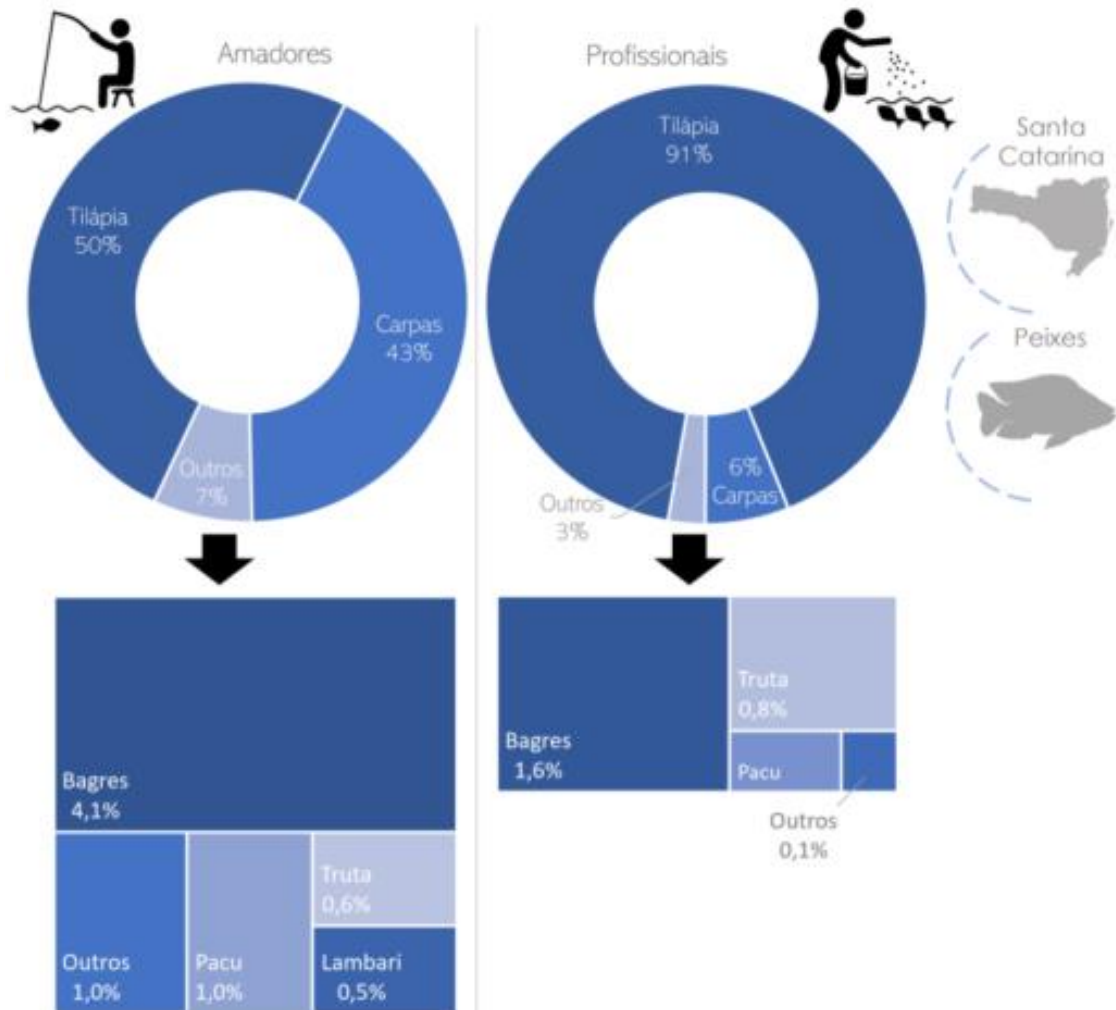
Atualmente, no mercado industrial, a GELITA™ destaca-se como a líder mundial na distribuição de peptídeos de colágeno. Fundada em 1875 em Eberbach, Alemanha, a empresa utiliza principalmente colágeno proveniente de subprodutos suínos e bovinos em uma ampla variedade de produtos. Estes são utilizados em diversas aplicações, como suplementos alimentares, cosméticos para cuidados com a pele, saúde articular, tendinosa e óssea, além de auxiliar no fortalecimento muscular (GELITA, 2024). No contexto brasileiro, a GELNEX™ emerge como a principal fornecedora, estabelecendo-se como líder em vendas de gelatina e peptídeos de colágeno de origem suína e bovina, por meio da marca PEPTINEX®. Fundada em 1998 em Itá, Santa Catarina, a empresa expandiu suas operações para São Paulo, Goiás, Tocantins e Mato Grosso. Seus produtos são amplamente utilizados em suplementos e aditivos alimentares, bem como em produtos cosméticos. O processo de obtenção dos peptídeos de colágeno da GELNEX™ envolve hidrólise térmica e química, seguido de hidrólise enzimática, geralmente utilizando pepsina. Por sua vez, a gelatina é produzida por meio de uma hidrólise parcial do colágeno nativo (GELNEX, 2024).

### 3.8 TILÁPIA NO BRASIL

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o consumo de animais aquáticos tem aumentado significativamente. Dados de 2020 estimam um consumo anual de 20,2 kg per capita; além disso, até 2030 é projetado um aumento deste valor para 21,4 kg (FAO, 2022). O Brasil é 4º maior produtor de tilápias (*Oreochromis niloticus*) do mundo. A China ainda lidera o ranking, com uma produção anual de 2,1 milhões de toneladas, seguida

por Indonésia e Egito. Além disso, a tilápia é o peixe de água doce com maior produção no Brasil (Figura 10). Anualmente, são produzidas cerca de 534 mil toneladas, com um crescimento médio de 5% ao ano. O estado de Santa Catarina ocupa a 4º posição no *ranking* da produção brasileira de tilápia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2022). Os 3 municípios catarinenses com maior produção são Massaranduba, com uma produção anual de 2458 ton, Armazém, com uma produção anual de 2013 ton, e Rio Fortuna, com uma produção anual de 1897 ton; estes 3 municípios correspondem a 16,5% da produção total anual catarinense de tilápias (SOUZA; SILVA; NOVAES, 2022). A produção de tilápias destina-se praticamente inteira para a exportação; a tilápia corresponde a 88% da importação total de pescados do Brasil; os Estados Unidos são o principal destino e correspondem a aproximadamente 81% da exportação deste pescado. Outro comprador expressivo é de Taiwan, que importa subprodutos como pele, escamas, farinha e óleo. Os subprodutos não exportados, usualmente de pequenos produtores, são, em geral, destinados para obtenção de ração (farinha de peixe), silagem e bio-óleo (MOTA; COSTA FILHO; BARRETO, 2019).

Figura 10 Grupos de peixes mais produzidos em Santa Catarina, por piscicultores amadores e profissionais. Dados referentes a 2020.



Fonte: INFOAGRO/SC (2022).

Do peso total da tilápia, cerca de 30% correspondem ao filé, enquanto o restante é atribuído aos subprodutos, como pele, escamas, espinhas e vísceras (GJERDE et al., 2012).

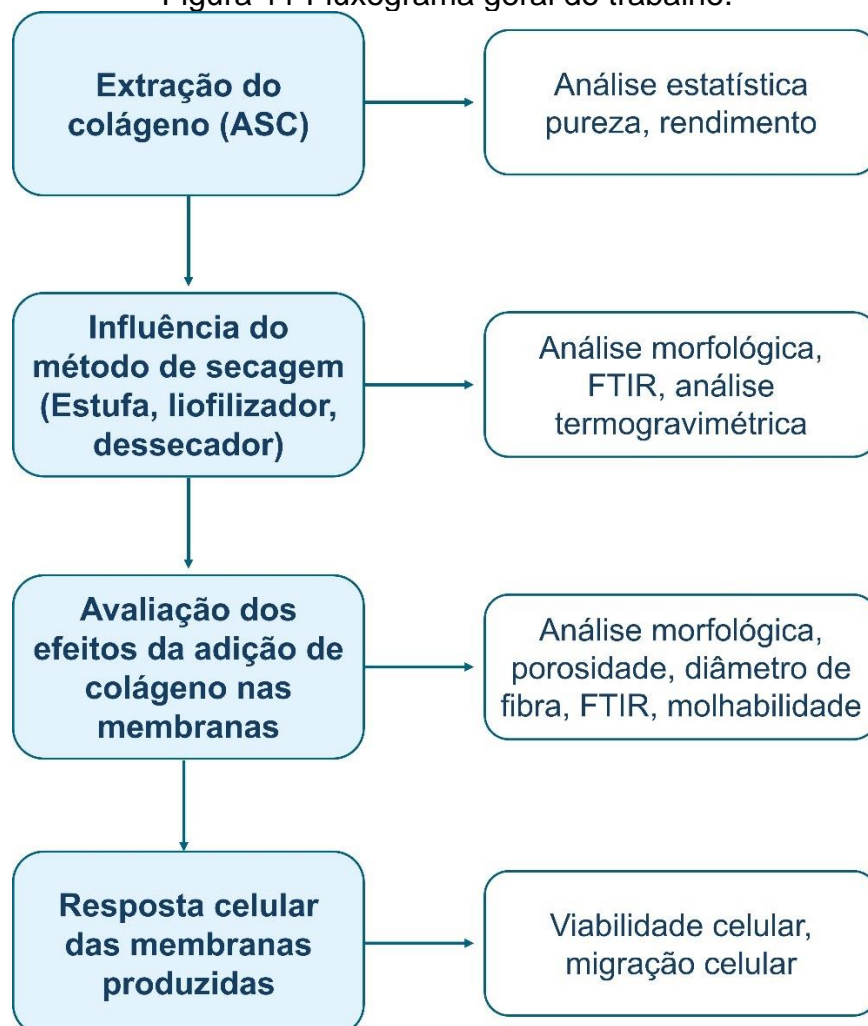
Estudos indicam que o colágeno extraído de pele de tilápia possui propriedades notáveis como um biomaterial, tais como a capacidade de promover a proliferação celular, a angiogênese e não ser citotóxico; além disso, por ser um dos principais constituintes da ECM, facilita a regeneração de tecidos e a reestruturação do equilíbrio celular (ZAIN; SAIDIN; SOSIAWAN, 2020). Estes fatores indicam que o colágeno apresenta propriedades notáveis para um curativo funcional. Além disso, o colágeno de tilápia possui capacidades antioxidantes (GÓMEZ et al., 2019) e inclusive antienvhecimento (WANG et al., 2017).

Assim, a tilápia é um potencial latente para o desenvolvimento socioeconômico de Santa Catarina. A busca por uma valorização dos subprodutos gerados pela indústria dos frigoríficos se torna uma alternativa viável para a produção de produtos de alto valor agregado, como colágeno.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este capítulo descreve o processo de extração e caracterização de colágeno da pele de tilápia, com foco nas variações no tempo de extração ácida e no tempo de purificação. Além disso, aborda a obtenção e caracterização de membranas eletrofiadas de colágeno e poliácido láctico (PLA), visando aplicações específicas na regeneração de feridas. A Figura 11 apresenta, de forma esquemática, os passos propostos para se alcançar os objetivos deste estudo, destacando a sequência de etapas envolvidas no processo, desde a extração do colágeno até a produção das membranas eletrofiadas. Esse trabalho visa contribuir para o avanço no desenvolvimento de biomateriais promissores para a área biomédica, com potencial aplicação clínica na regeneração de tecidos e tratamento de feridas.

Figura 11 Fluxograma geral do trabalho.



Fonte: Do autor (2024).

Neste trabalho, todos os reagentes empregados foram de pureza analítica, a menos que sejam especificados de outra forma.

#### 4.1 COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA

##### 4.1.1 Extração do colágeno

Peles de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram doadas por uma empresa de filetagem da região Sul de Santa Catarina. As peles foram congeladas e mantidas a -8 °C até o início da extração. Para a extração do colágeno, as peles foram descongeladas, limpas de escamas, resíduos de carne, lavadas em água corrente e cortadas em pequenos pedaços quadrados de, aproximadamente, 2 cm x 2 cm com o auxílio de uma tesoura.

Na sequência, as peles entumecidas foram imersas em uma solução de álcool etílico (Dinâmica, 70 %) por 24 h a uma razão de 1:10 (m/v) para retirada de lipídios e impurezas das peles. Posteriormente, foram retiradas deste banho e lavadas em água corrente até a completa remoção do álcool.

Posteriormente, as peles foram submetidas a um banho contendo NaOH (Neon) a 0,5 mol/L por 24 h a uma razão de 1:10 (m/v). Esta etapa é responsável pela retirada de pigmentos e proteínas solúveis em meio básico não colagenosas. Na sequência, as peles foram novamente lavadas em água corrente até o pH alcançar valores neutros, seguido por duas lavagens em água deionizada fria. Por fim, as peles foram submetidas a uma solução contendo ácido acético (Neon) a uma concentração de 0,5 mol/L por 24, 48 e 72 h. Esta etapa é responsável pela extração do colágeno em uma solução ácida. Por esse motivo, o nome da metodologia é ASC.

Após o tratamento ácido, a solução contendo colágeno é separada das peles não solubilizadas. As peles coletadas foram descartadas. Todos os procedimentos foram realizados a baixa temperatura, usando banho de gelo e mantidas o mais próximo possível de 4 °C.

#### 4.1.2 Isolamento e purificação do colágeno

O líquido resultante após o processo de extração em ácido acético foi submetido a um processo de *salting-out*. NaCl (Êxodo científica) foi, então, adicionado lentamente até uma concentração de 0,9 M e centrifugado a 10.000 g por 30 min em uma centrífuga (Eppendorf, 5804 R) refrigerada a 4°C. Subsequentemente, o precipitado foi coletado e submetido a um processo de purificação por diálise, com uma membrana de diálise (Servapor 12~14 kDa), primeiramente contra ácido acético 0.1 M por 24 h e, posteriormente, contra água deionizada em 3 tempos diferentes por 24, 48 e 72 h. A diálise foi realizada a uma proporção de 1:50 (v/v), com a troca da solução a cada 24 h. A Figura 12 demonstra uma representação esquemática dos passos seguidos na obtenção do colágeno pelo método ASC.

Figura 12 Representação esquemática da obtenção e purificação de colágeno pelo método ASC.



Fonte: Do autor (2024).

O concentrado resultante foi, então, submetido a 3 modelos diferentes de secagem, ilustrados na Figura 13: por estufa (Cienlab, CE-220/100) a 100 °C, em um dessecador em temperatura ambiente (SPLabor, Ø 200 mm) e por liofilização

(Liobras, k105) nas condições, 81  $\mu$ Hg e -94 °C. A liofilização continuou até não se observar mais mudanças na massa.

Figura 13 Métodos de secagem para o colágeno purificado.



Fonte: Do autor (2024).

#### 4.1.3 Planejamento experimental

Após a seleção do método de secagem, as variáveis tempo em ácido e tempo em diálise, e suas influências no rendimento do colágeno obtido, foram analisadas a partir de um planejamento experimental com o auxílio do *software* STATISTICA, usando análise de variância (ANOVA). O modelo quadrático foi adotado do tipo 2<sup>2</sup> com ponto central em duplicata. A Tabela 1 demonstra o nomes das amostras bem como os fatores.

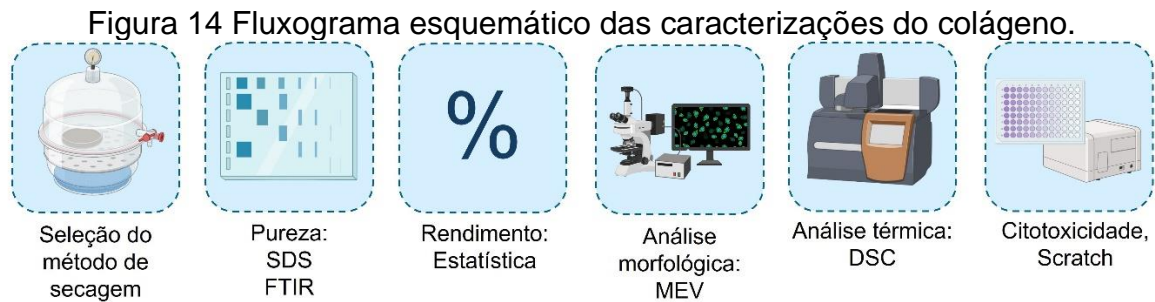
Tabela 1 Planejamento experimental

Experimento	Tempo em ácido (h)	Tempo em diálise (h)
X	24 (-)	24 (-)
K	24 (-)	72 (+)
W	72 (+)	24 (-)
Y	72 (+)	72 (+)
Z.1	48 (0)	48 (0)
Z.2	48 (0)	48 (0)

Fonte: Do autor (2024).

#### 4.1.4 Caracterização do colágeno

O colágeno foi caracterizado quanto à pureza, ao rendimento, à morfologia, às propriedades térmicas, à citotoxicidade e ao potencial de cicatrização de feridas. A Figura 14 ilustra as análises realizadas.



Fonte: Do autor (2024).

##### 4.1.4.1 Pureza

Para avaliar a pureza a partir dos grupos funcionais presentes no colágeno, foi usado espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker).

A pureza foi confirmada pelo método do dodecil sulfato de sódio por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970). Para isso, o colágeno seco por liofilização foi homogeneizado em tampão Laemmli, usando beta-mercaptoetanol como redutor (62,5 mM TrisHCl, pH 6,8, 1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio, 10% (v/v) de glicerol) e quantidades iguais de proteína (30 µg/poço) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose. A eficiência da transferência eletroforética foi verificada pela coloração com reagente de Ponceau e a membrana foi então bloqueada em tampão Tris-Tween salino (TTBS: 100 mM Tris HCl, pH 7,5, contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 20).

##### 4.1.4.2 Rendimento

O rendimento das amostras foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do colágeno liofilizado}}{\text{Massa das peles secas}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Para determinar a massa seca, as peles foram secas em uma estufa (Cienlab, CE-220/100) a 100 °C por 24 h.

Análise estatística foi realizada utilizando-se o software STATISTICA 10.0 por meio de análise de variância (ANOVA), usando o rendimento como variável de resposta. O modelo quadrático foi aplicado a experimentos fatoriais de dois níveis utilizando pontos centrais. Ao adicionar um termo de interação a um modelo de efeitos principais de primeira ordem, temos um modelo capaz de representar uma curvatura na variável de resposta. Essa curvatura é o resultado de uma "torção" no plano induzido pelos termos de interação. Mais especificamente, quando pontos centrais são adicionados a um delineamento fatorial, o teste de curvatura realmente testa as hipóteses, verificando a passagem do menor (-) nível para o maior (+) nível, observando a interação quadrática e não apenas uma função linear.

#### 4.1.4.3 Análise Morfológica: Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos colágenos obtidos nas condições experimentais foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, EVO MA10, Zeiss). As amostras foram revestidas com ~1-2 nm de espessura de ouro (Q156R-ES, Quorum).

#### 4.1.4.4 Resposta Celular

A citotoxicidade do colágeno e das membranas foi examinada usando-se o ensaio AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad). Este ensaio serve como indicador da atividade metabólica e proliferação celular, que pode ser correlacionada com a viabilidade celular, já que células metabolicamente ativas são capazes de converter sal de resazurina e são consideradas saudáveis e viáveis. Fibroblastos murinos L929 foram cultivados em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS; GIBCO, Thermo Fisher Scientific) e 1% de penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). As células foram mantidas em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C antes da realização

do teste celular *in vitro*. Os materiais foram esterilizados usando luz UV por 1 h e então colocados em uma placa de 24 poços, submersos no meio de cultura. Após 24 h, o meio de cultura foi removido e as células foram sediadas nos materiais com uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço. As células foram incubadas por 48 h a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. Após a incubação, o reagente de sal de sódio de resazurina foi adicionado a cada poço com uma concentração de 10% v/v e incubado por mais 4 h. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços. A atividade metabólica das células foi determinada medindo o produto da reação, usando-se um leitor de placas múltiplas em comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

O ensaio de *scratch* consiste em criar uma ferida e mensurar a taxa de migração das células. Para tal, foram utilizadas duas placas de cultura de 12 poços (Kasvi) e as células foram plaqueadas em uma concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço. Após 48 h de incubação a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade e as células já confluentes em monocamada, foi realizado um arranhão feito no sentido vertical com o uso de uma ponta de pipeta P20 (TPP). O meio de cultura foi aspirado e foi colocado 1 mL de solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) para lavar e eliminar as células que foram despreendidas durante a confecção da ferida. O PBS foi aspirado e as amostras de membranas e colágeno foram inseridas em cada poço. A partir deste momento, as placas foram levadas ao microscópio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss) com uma câmera fotográfica acoplada (AxioCam mrrn, Zeiss) usando uma objetiva de 10x (abertura Eclan-Neofluar 10x / 0.3 Zeiss) e imagens foram capturadas no primeiro período e a cada 24 h durante 48 h. Imagens de migração celular foram analisadas usando-se o Software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde).

Para cálculo da migração celular fez-se uso da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de migração} = \frac{(\text{Area pré migração} - \text{area da migração})}{\text{Area pré migração}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

## 4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA ELETROFIAÇÃO

### 4.2.1 Preparo das soluções de PLA

Inicialmente, foi preparada uma solução 10% (v/v) de PLA em clorofórmio (Synth). A homogeneização foi realizada com o auxílio de um agitador magnético (Fisotam 753 A) sob a temperatura ambiente (25 °C) e velocidade de 300 rpm. O conjunto foi mantido sob agitação constante por 24 h. Esta solução foi denominada de PPuro.

### 4.2.2 Preparo das soluções de colágeno

O colágeno liofilizado obtido na etapa anterior foi solubilizado em ácido acético a uma concentração de 0,2 g/mL e deixado sob agitação, com um auxílio de um agitador magnético, por 24 h a temperatura ambiente.

### 4.2.3 Preparo das soluções de PLA e colágeno

As soluções de PLA e colágeno foram então misturadas em diferentes concentrações; a solução de colágeno foi adicionada gota a gota à solução de PLA até se obter uma concentração de 10 e 20% (v/v) da solução de colágeno, obtendo-se desta forma as soluções PCol 9010 e PCol 8020, respectivamente.

A fim de se avaliar estritamente o efeito da adição de colágeno nas membranas, duas outras soluções com as mesmas concentrações foram preparadas, porém sem a adição de colágeno. Desta forma, ácido acético foi adicionado gota a gota à solução de PLA até uma concentração de 10 e 20% (v/v) de ácido acético, obtendo-se as soluções P 9010 e P 8020.

As soluções foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético (Fisatom) por 4 h.

#### 4.2.4 Eletrofição das membranas

As soluções preparadas foram inseridas em uma seringa de plástico de 5 mL conectada a uma agulha metálica bico *luer slip* de 25 mm x 0,7 mm (Descarpack) e submetidas ao processo de eletrofição (DBM Eletrotech). As membranas foram coletadas em um coletor cilíndrico rotativo de 21 cm x 7 cm envolto em papel alumínio. A fim de identificar o efeito da adição de colágeno nas membranas quanto à *spinabilidade* da solução, as variáveis do processo se mantiveram constantes para todas as membranas. Foi utilizada uma taxa de 0,20 mL/min, tensão de 20 kV, distância da agulha com o coletor de 15 cm e rotação do coletor constante de 500 rpm.

#### 4.2.5 Caracterização das membranas

##### 4.2.5.1 Caracterização morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV, Zeiss, EVO MA 10) foi utilizada para a avaliação morfológica das membranas de PLA com diferentes concentrações de colágeno tipo I. Esta caracterização é importante, pois por meio dela foram calculadas os diâmetros das fibras para verificar se são adequados para aplicação. O diâmetro médio e o desvio padrão das fibras foi calculado pelo software Image J; pelo menos 100 fibras foram avaliadas por imagem por meio do método do intercepto linear.

##### 4.2.5.2 Caracterizações físicas

###### Densidade aparente

Para caracterizar a densidade aparente geométrica, a membrana foi cortada em partes de aproximadamente 1 mm x 1 mm e, logo após, foram medidas as dimensões; a espessura foi medida utilizando-se um micrômetro (Mitutoyo, MDC-Lite). Posteriormente, foram pesadas e calculada a densidade aparente conforme a Equação 2:

$$D_{ap} = \frac{m}{v} \quad \text{Equação (3)}$$

onde  $d$  é a densidade aparente ( $\text{g/cm}^3$ ),  $m$  é a massa (g) e  $v$  é volume ( $\text{cm}^3$ ).

#### Densidade real por picnometria

A densidade real de cada amostra foi determinada por picnometria ao gás hélio (Ultrapyc, Anton Paar).

#### Densidade relativa

A densidade relativa foi calculada relacionando-se as medidas de densidade aparente e real das amostras, conforme a Equação 3:

$$D_{rel} = \frac{D_{ap}}{D_{real}} \quad \text{Equação (4)}$$

onde  $D_{rel}$  é a densidade relativa,  $D_{ap}$  é a densidade aparente ( $\text{g/cm}^3$ ) e  $D_{real}$  é a densidade real ou verdadeira do sólido ( $\text{g/cm}^3$ ).

#### Porosidade

A porosidade foi calculada a partir dos valores de densidade relativa, conforme a Equação 4:

$$P = (1 - D_{rel}) \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

onde  $P$  é porosidade (%).

#### 4.2.5.3 Análise dos grupos funcionais presentes: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar os grupos funcionais presentes nas membranas, foi usada a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker).

#### 4.2.5.4 Molhabilidade

Para determinação da molhabilidade das membranas pela água foi realizado um ensaio de molhabilidade com o auxílio de uma câmera (Misura, HSM ODHT, TA instruments) disposta paralelamente com a membrana. Cada membrana foi cortada em retângulos de 1 x 1 cm e presas sobre uma superfície plana de alumina com as mesmas dimensões. Uma gota de água destilada de 20  $\mu$ L foi gotejada sobre a amostra e capturado os ângulos após 1 s do contato da gota com a membrana.

O ensaio de ângulo de contato foi realizado em triplicata.

#### 4.2.5.5 Análise térmica

Para analisar a temperatura de degradação das membranas e confirmar que não sofram degradação não prevista na temperatura do corpo humano, foi realizada análise térmica. As propriedades térmicas das amostras foram obtidas por meio de um analisador simultâneo DSC e TG (SDT-Q600, TA Instruments).

#### 4.2.5.6 Resposta Celular

A citotoxicidade e o ensaio de *scratch* foram realizados para as membranas eletrofiadas nas mesmas condições descritas na seção 4.1.4.4 para o colágeno puro.

Neste caso, membranas foram cortadas do tamanho dos poços e as células foram crescidas sobre elas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO

#### 5.1.1 Influência das variáveis de extração na pureza e rendimento do colágeno

##### 5.1.1.1 Pureza do colágeno: FTIR e SDS

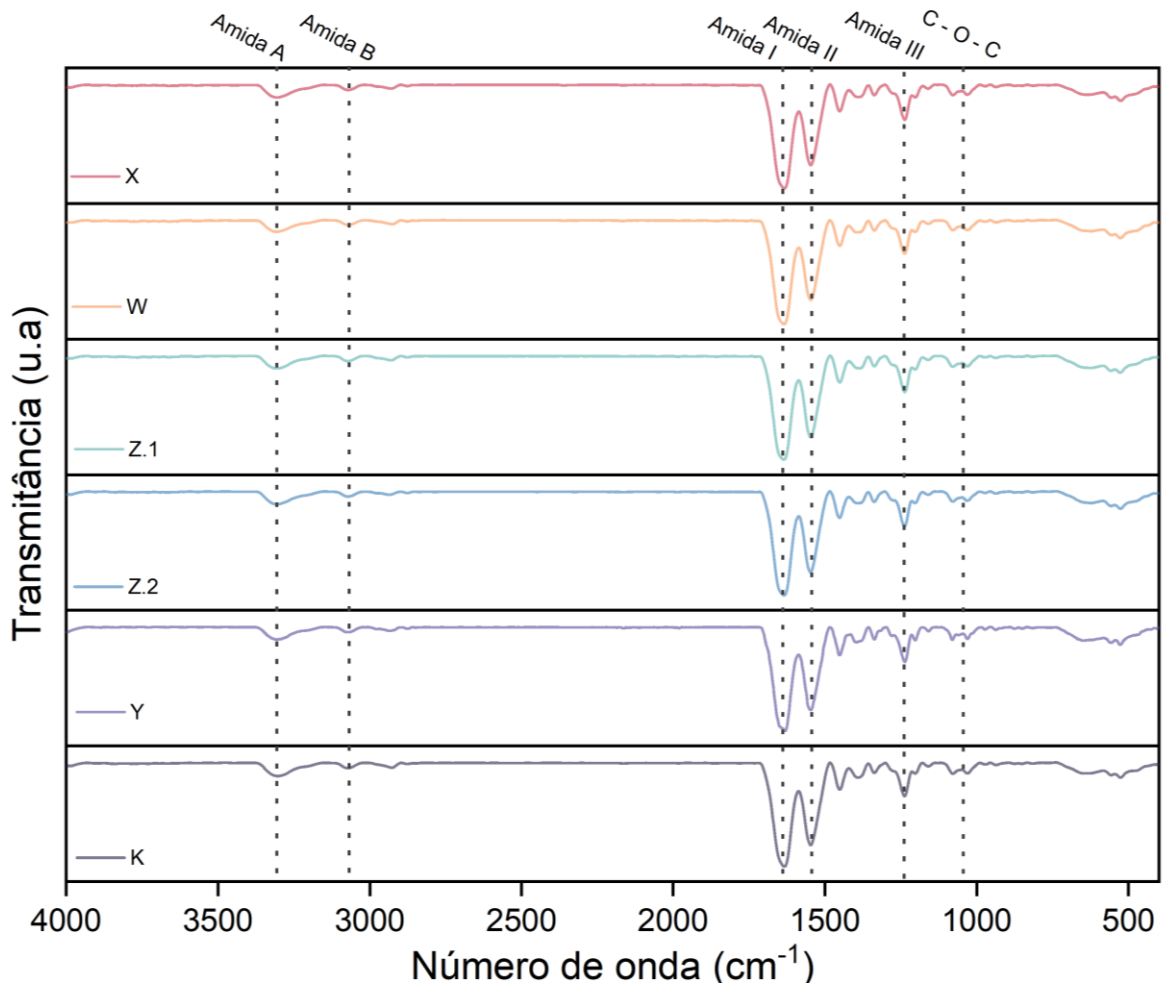
Para validar a eficácia do método de extração, torna-se necessário avaliar a pureza do colágeno. Para esse fim, foram empregadas 2 técnicas de análise, FTIR (Figura 15) e SDS-PAGE (Figura 16). A análise de FTIR é capaz de identificar a integridade que a tripla hélice do colágeno se encontra (BELBACHIR *et al.*, 2009). As bandas da Amida A foram observadas entre 3298-3275  $\text{cm}^{-1}$ ; esta banda é tipicamente associada com a vibração de estiramento da ligação N-H e a presença de ligações de hidrogênio (HUKMI; SARBON, 2018). Esta vibração usualmente ocorre na faixa de 3400-3440  $\text{cm}^{-1}$ ; contudo, quando peptídeos estão envolvidos na ligação de hidrogênio, as posições são trocadas para frequências mais baixas, usualmente perto de 3300  $\text{cm}^{-1}$  (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004b). A banda associada à Amida B foi observada em 2925-2928  $\text{cm}^{-1}$ , no qual é associada com o estiramento assimétrico da ligação  $\text{CH}_2$  (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004a).

A Amida I, II e III são diretamente associadas à configuração da hélice do colágeno (HEU *et al.*, 2010). A vibração da banda da Amida I, associada com o número de onda 1629-1646  $\text{cm}^{-1}$ , é relacionada com a vibração da ligação  $\text{C}=\text{O}$  na extremidade do colágeno, ou com a banda  $\text{H}_2$  ligada com  $\text{COO}^-$  (ATEF *et al.*, 2020a). A Amida II e Amida III observadas em 1529-1551  $\text{cm}^{-1}$  e 1236-1240  $\text{cm}^{-1}$  representam a vibração de dobramento da ligação N-H e a vibração de estiramento da ligação C-N, respectivamente (HOU; CHEN; JEN, 2023). A intensidade das bandas da Amida I e Amida III são usualmente associadas com a integridade da tripla hélice do colágeno; a intensidade e o formato dos picos determinam a integridade do colágeno (AHMAD; BENJAKUL, 2010).

O espectro de FTIR das amostras de colágeno obtidas nas diferentes condições do planejamento experimental não demonstrou diferenças significativas

entre as amostras, indicando que as seis condições diferentes apresentam estruturas e composições extremamente semelhantes.

Figura 15. FTIR das amostras de colágeno liofilizadas.



Fonte: Do autor (2024).

A técnica de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) consiste na aplicação de um campo elétrico em um gel com uma porosidade predeterminada, a proteína é primeiramente desnaturada, e inserida em poços localizados na parte superior do gel. Amostras com maior massa molar tem dificuldade de passar pelos poros do gel e demoram um tempo maior para percorrer o gel, quanto maior o tempo que a amostra leva para percorrer o gel, maior a marcação indicada pelo reagente colorimétrico (LAEMMLI, 1970).

A técnica de SDS-PAGE foi utilizada para determinar a pureza por meio do peso molecular da estrutura do colágeno extraído, a figura 16 exhibe os padrões obtidos das amostras.

Na região de aproximadamente 120kDa foi possível observar as bandas correspondentes as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , a cadeia  $\alpha 2$  apareceu ligeiramente abaixo da cadeia  $\alpha 1$ . A presença das bandas e o peso molecular observado nas cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  determinam o tipo e qualidade do colágeno. O colágeno Tipo I é formado por repetições específicas de aminoácidos, estas repetições formam longas cadeias polipeptídicas que se dobram e se enrolam formando uma tripla hélice (RICARD-BLUM, 2011). Além disso é possível observar uma maior coloração e alargamento da banda  $\alpha 1$ , isso está associado ao colágeno do Tipo I ser composto por duas cadeias  $\alpha 1$  e uma  $\alpha 2$ .

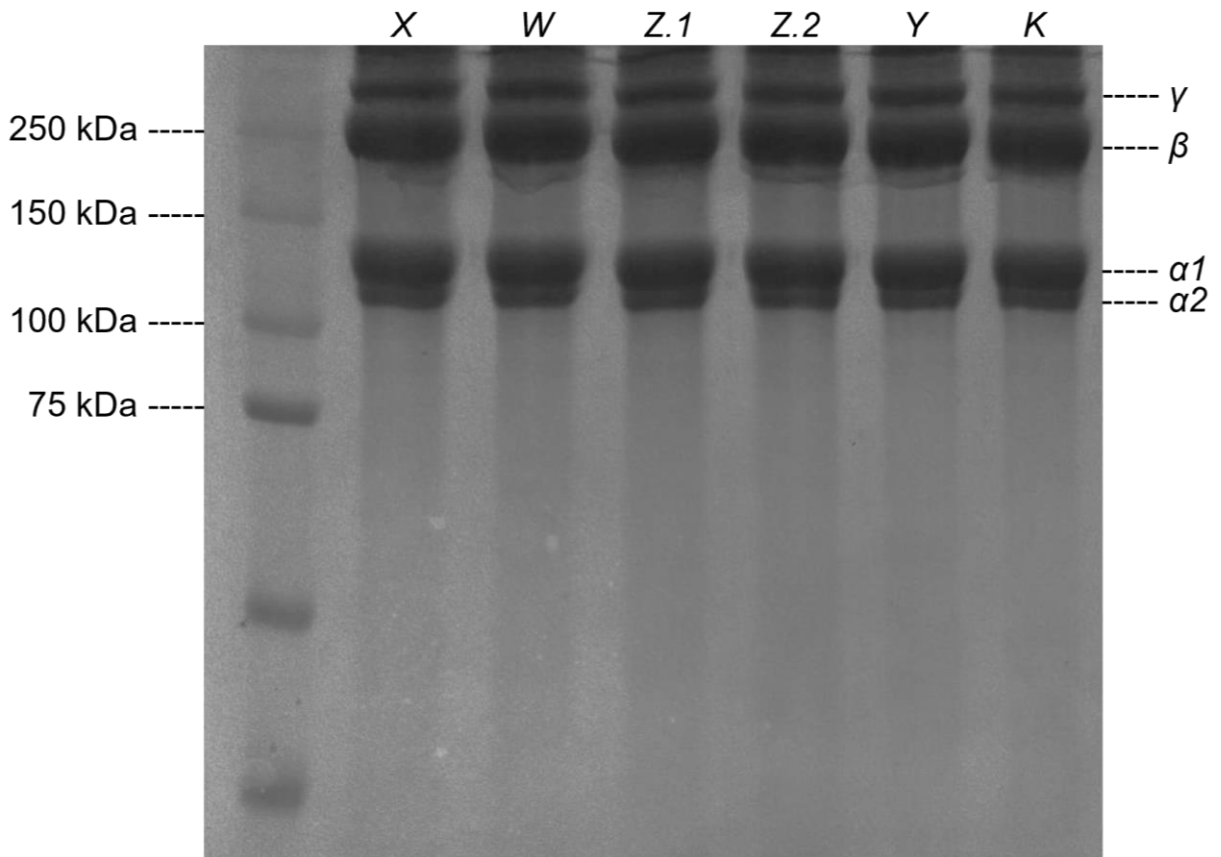
As duas bandas principais que compõem o colágeno e são responsáveis pela formação da tripla hélice, chamadas de  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , foram observadas na região em aproximadamente 120kDa, a banda correspondente a  $\alpha 2$  apareceu ligeiramente abaixo da banda  $\alpha 1$ . A presença das bandas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  confirmam a identidade do colágeno de Tipo I, com suas principais cadeias polipeptídicas visíveis e separadas.

Além disso, é possível observar uma banda  $\beta$ , na região em aproximadamente 230kDa. Esta banda está associada a presença de dímeros de colágeno, formados por ligações covalentes entre as cadeias do colágeno (COELHO et al., 2017).

Bandas adicionais foram identificadas na região acima de 250 kDa. A presença da banda  $\gamma$  indica a formação de trímeros, resultantes da associação covalente entre três cadeias de colágeno (RICARD-BLUM, 2011). A presença de dímeros e, sobretudo de trímeros, está intrinsecamente ligado a configuração natural de tripla hélice do colágeno, tal como, encontrado nos seres vivos.

O aparecimento das bandas  $\beta$  e  $\gamma$  é um indicativo da existência de ligações intermoleculares entre as proteínas do colágeno, a forte presença destas bandas indicam também que o colágeno não desnaturou durante os processos de extração empregados, fator que garante a sua funcionalidade.

Figura 16 Padrões de SDS-PAGE da amostra liofilizada. Faixa 1, marcador de peso molecular de proteína padrão; faixas 2-6 amostras de colágeno.



Fonte: Do autor

Os dados obtidos pela análise de SDS, juntamente com a análise de FTIR comprovam que a proteína extraída é colágeno do Tipo I, e constata que a molécula está em sua estrutura nativa de tripla hélice.

#### 5.1.1.2 Rendimento

A Tabela 2 mostra os resultados de rendimento das amostras do planejamento experimental.

Tabela 2 Rendimento das amostras liofilizadas

Amostra	Rendimento	
X 2424	0,1054 g	0,65%
W 7224	0,0820 g	0,51%

Z1 4848	0,1482 g	0,92%
Z2 4848	0,0845 g	0,52%
Y 7272	2,240 g	13,95%
K 2472	0,436 g	1,35%

Fonte: Do autor, 2024.

As amostras liofilizadas obtiveram um rendimento médio de  $13,95 \pm 1,7\%$ , quando comparado com o peso das peles secas. Este valor é menor do que o obtido da pele de tubarão-gato (*Scyliorhinus canícula*) de 61,2% (BLANCO et al., 2019) e próximo ao obtido a partir da pele de atum (*Thunnus thynnus*) de 18,8% (AHMED et al., 2018). Esse resultado está de acordo com outros autores, que encontraram resultados similares na extração ASC de pele de tilápia (SONG et al., 2021; ZHANG et al., 2016).

### 5.1.1.3 Análise estatística

Assegurar a pureza do colágeno e otimizar o processo e o tempo de obtenção dele são fatores essenciais para viabilizar a produção deste biomaterial. As 5 amostras obtidas por diferentes tempos de banho ácido e diálise foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA). A Tabela 3 mostra os valores obtidos por meio da análise.

Tabela 3 Análise de variância (ANOVA) para rendimento.

Fator	SQ	V	MQ	F	P
Curvatura	0,396033	1	0,396033	195,2014	0,045488
AcOH (h)	0,998600	1	0,998600	492,2015	0,028676
Diálise (h)	1,288906	1	1,288906	635,2906	0,025244
1 a 2	1,045915	1	1,045915	515,5225	0,028020
Erro	0,002029	1	0,002029		
SQ Total	3,731484	5			

Fonte: Do autor (2024).

No qual, SQ é a soma dos quadrados, V é a variância ou graus de liberdade, MQ é a média quadrática, F é o fator de teste-F e P é o nível de significância.

De acordo com os resultados da análise estatística de variância (ANOVA), foi observado que o tempo de contato com o banho ácido, o tempo de diálise e a interação entre esses dois fatores têm uma significância estatística em relação à alteração do rendimento, com um nível de confiança superior a 95%. Além disso, o  $R^2$  e o  $R^2$  ajustado, que foram de 0,99946 e 0,99728, respectivamente, indicam uma correlação praticamente perfeita entre as variáveis estudadas. Valores de  $R^2$  ajustado entre 0,9801 e 1 são considerados ideais e sugerem que o experimento segue uma distribuição normal (MONTGOMERY; RUNGER, 1994).

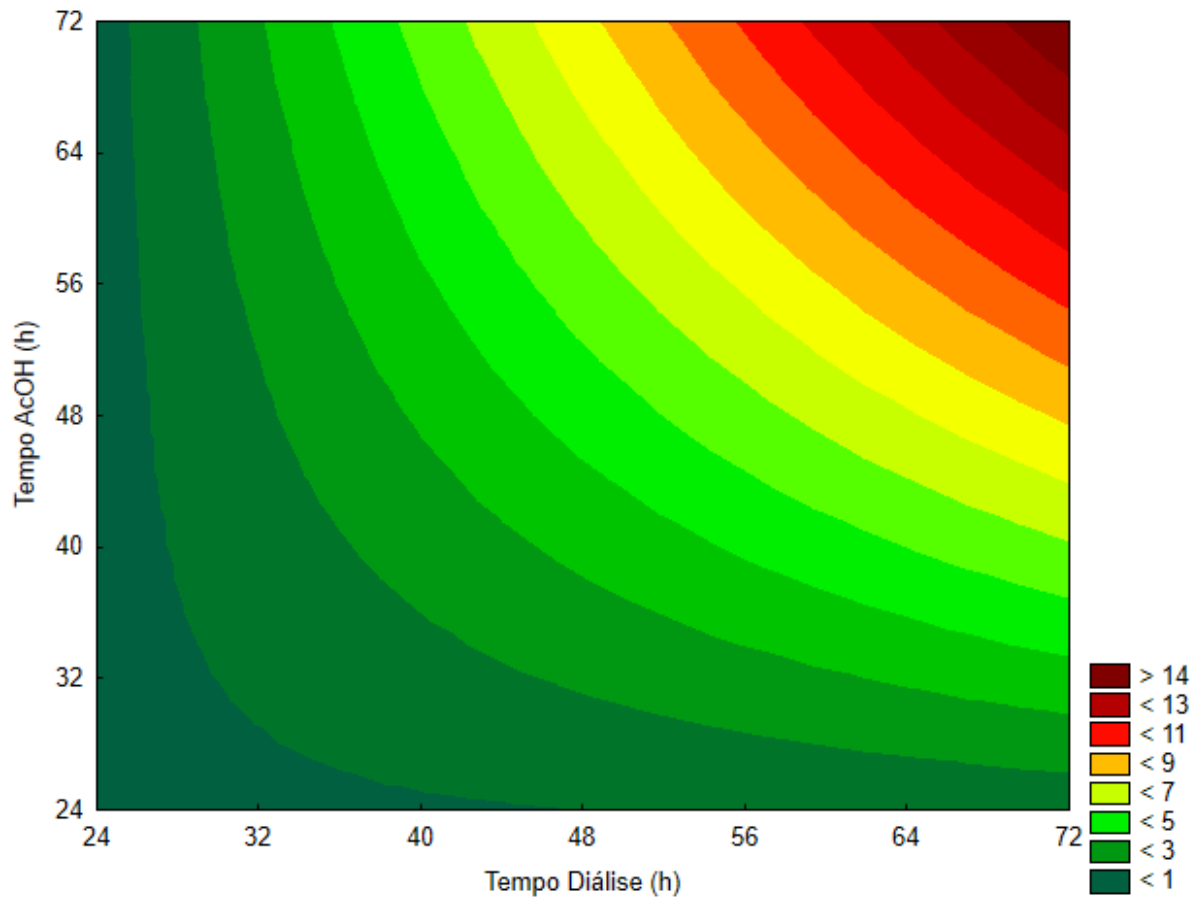
Era esperado que as amostras expostas a diferentes tempos de contato com o banho ácido apresentassem rendimentos distintos, o que foi corroborado pelos resultados dos experimentos. No entanto, não era esperado que o rendimento aumentasse com o prolongamento do tempo de diálise. A diálise é um processo de purificação que remove impurezas por meio da permeação do líquido circundante, geralmente água, por uma membrana polimérica com poros controlados. As impurezas menores que os poros da membrana atravessam os orifícios e são eliminadas por difusão para o líquido externo. Assim, seria de se esperar que o tempo de diálise influenciasse a pureza do colágeno; no entanto, todas as amostras alcançaram resultados satisfatórios em termos de pureza do biomaterial, sugerindo que um período de 24 h de diálise seria ideal.

Surpreendentemente, os resultados indicam que tempos mais longos de diálise aumentam o rendimento do colágeno e isso é observado com uma significância maior do que o tempo de exposição ao banho ácido. Este achado é particularmente intrigante, pois o processo de diálise é geralmente associado à purificação e não aos aumentos de rendimento. Portanto, é plausível supor que outro processo esteja ocorrendo simultaneamente à diálise, contribuindo para esse aumento de rendimento.

A Figura 17 mostra o gráfico de contorno, que é capaz de determinar os valores resultantes da variável dependente, que serão obtidos dentro de qualquer valor estipulado entre o intervalo máximo e o mínimo das variáveis independentes. O gráfico de contorno é usado para otimizar processos e é responsável pela determinação de valores específicos, que podem ser obtidos por meio da manipulação das variáveis dependentes (WINARNI; SUNENSIH; GINANJAR, 2021). Neste caso,

demostra que o aumento do tempo de contato com o ácido acético, juntamente com o aumento do tempo de diálise, é responsável pelo maior valor possível de rendimento (área vermelha). E, por consequência, os menores tempos de contato com o ácido e os menores tempos em diálise promovem os menores valores de rendimento (área verde).

Figura 17 Superfície de contorno para rendimento.



Fonte: Do autor (2024).

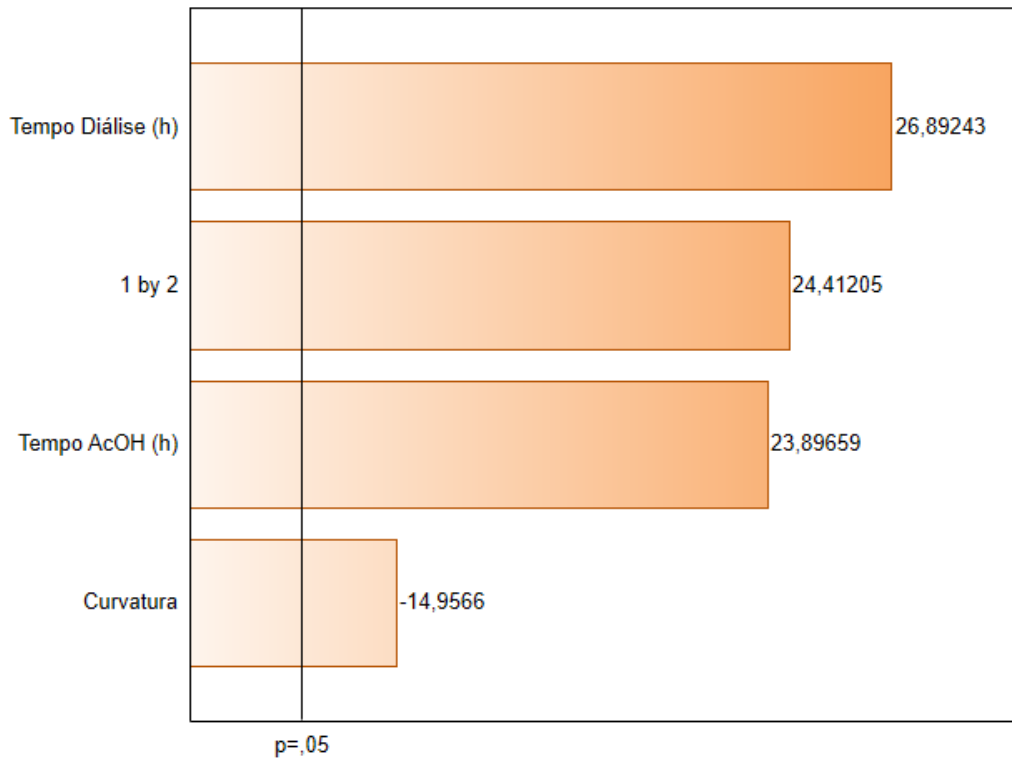
Entende-se que as fibras de colágeno possuem a capacidade de *self-assembly* (auto-organização) em água, que consiste na reorganização espacial das moléculas de tropocolágeno para formar colágeno. As moléculas de tropocolágeno atuam como precursores e, por meio de ligações químicas secundárias, se conectam para criar a estrutura do colágeno (PARVIZI; KIM, 2010). O colágeno, em sua forma estruturada, possui um ponto isoelétrico próximo a pHs neutros, o que justifica sua baixa solubilidade em água (YANG et al., 2020). Para se obter uma solução de colágeno, é necessário quebrar essas ligações secundárias e transformar o colágeno

novamente em moléculas de tropocolágeno. Geralmente, ácidos são usados para quebrar essas ligações; contudo, o aumento da disposição de íons  $H^+$  pode levar ao desdobramento da cadeia do tropocolágeno e, conseqüentemente, a quebra dessa cadeia em peptídeos menores (HARRIS et al., 2021).

Neste contexto, o método de extração ASC é capaz de, parcialmente, quebrar as ligações químicas e transformar parte do colágeno em peptídeos menores, fato que explica a alta solubilidade do colágeno em meios ácidos. Assim, durante a diálise, os peptídeos de colágeno, por conta do seu peso molecular menor que o da malha da membrana, podem vagar livremente da membrana de diálise para o líquido (ANDREW; TITUS; ZUMSTEIN, 2001). Contudo, por conta da característica intrínseca e observada do colágeno de *self-assembly*, estes peptídeos menores podem voltar à membrana e se reestruturarem em cadeias maiores, impossibilitando a sua saída para o meio líquido novamente (SKOPINSKA-WISNIEWSKA et al., 2014), o que justifica o aumento do rendimento com os maiores tempos de diálise.

O diagrama de Pareto é mostrado na Figura 18 e é capaz de prever o efeito das variáveis no resultado. Ele dita, portanto, o peso que cada variável tem e, conseqüentemente, é capaz de prever qual variável tem maior influência na variável dependente (ALKIAYAT, 2021). Neste caso, o processo de diálise tem maior efeito no rendimento do que o tempo das peles em contato com o ácido acético, além de maior efeito do que a interação entre esses dois fatores.

Figura 18 Diagrama de Pareto para rendimento.



Fonte: Do autor (2024).

Portanto, o tempo de diálise da pele de tilápia não é só responsável pela pureza do colágeno, mas, mais importante ainda, foi responsável por um aumento do rendimento obtido.

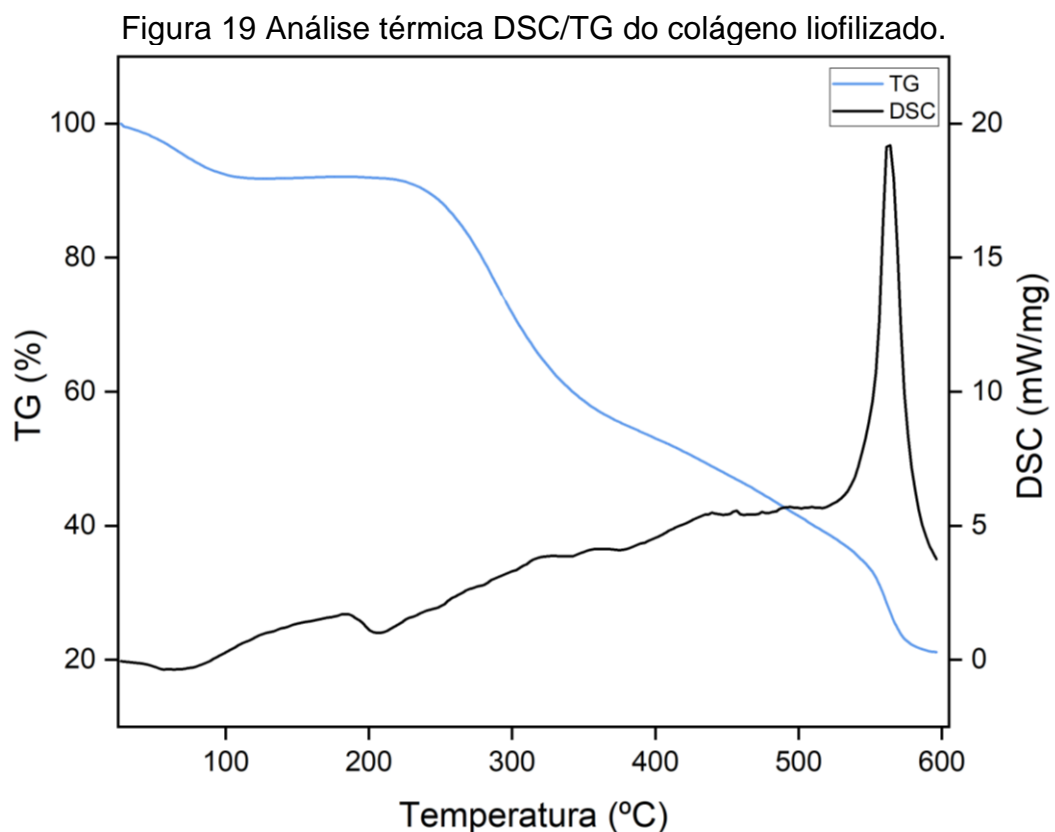
### 5.1.2 Influência da secagem nas características do colágeno

#### 5.1.2.1 Análise térmica (DSC/TG)

A análise térmica é importante na caracterização do colágeno para compreender as condições ideais para preservar sua estrutura e, conseqüentemente, sua funcionalidade. Além disso, a análise térmica pode otimizar o processo de extração, a temperatura de armazenamento e a formulação de produtos com colágeno, garantindo sua estabilidade e efetividade com o decorrer do tempo. A temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) do colágeno é um fator-chave para garantir a estabilidade térmica da proteína e suas propriedades. A desnaturação do colágeno consiste no desdobramento e subsequente quebra da triple hélice e suas ligações

peptídicas, resultando na perda de sua estrutura e propriedades biológicas (ATEF et al., 2020b). A  $T_d$  obtida na análise de DSC da amostra de colágeno foi de 37 °C, como apresentado na Figura 19. Isso é consistente com outros autores que encontraram  $T_d$  similares (SONG et al., 2021; ZENG et al., 2009). Outro fator para se levar em consideração é a região onde a tilápia habita, regiões de menores temperaturas podem gerar uma variação na  $T_d$  do colágeno (BAE et al., 2008; MUHAMMED et al., 2018; NILSUWAN et al., 2022).

A análise termogravimétrica (TGA) foi conduzida no colágeno liofilizado. A TGA da amostra de colágeno, demonstrada na Figura 19, demonstra a rápida perda de massa com o aumento de temperatura na faixa entre 40 a 120 °C; essa perda é associada à evaporação de umidade residual da amostra e à quebra de ligações peptídicas na reticulação do colágeno (ATEF et al., 2020b). A perda de massa registrada nessa faixa de temperatura reflete a remoção da água adsorvida e a liberação de água ligada nas regiões moleculares do colágeno. A molécula de colágeno retém água em sítios específicos e o aquecimento durante a TGA induz a liberação destas moléculas de água, resultando na perda de massa observada.



Fonte: Do autor (2024).

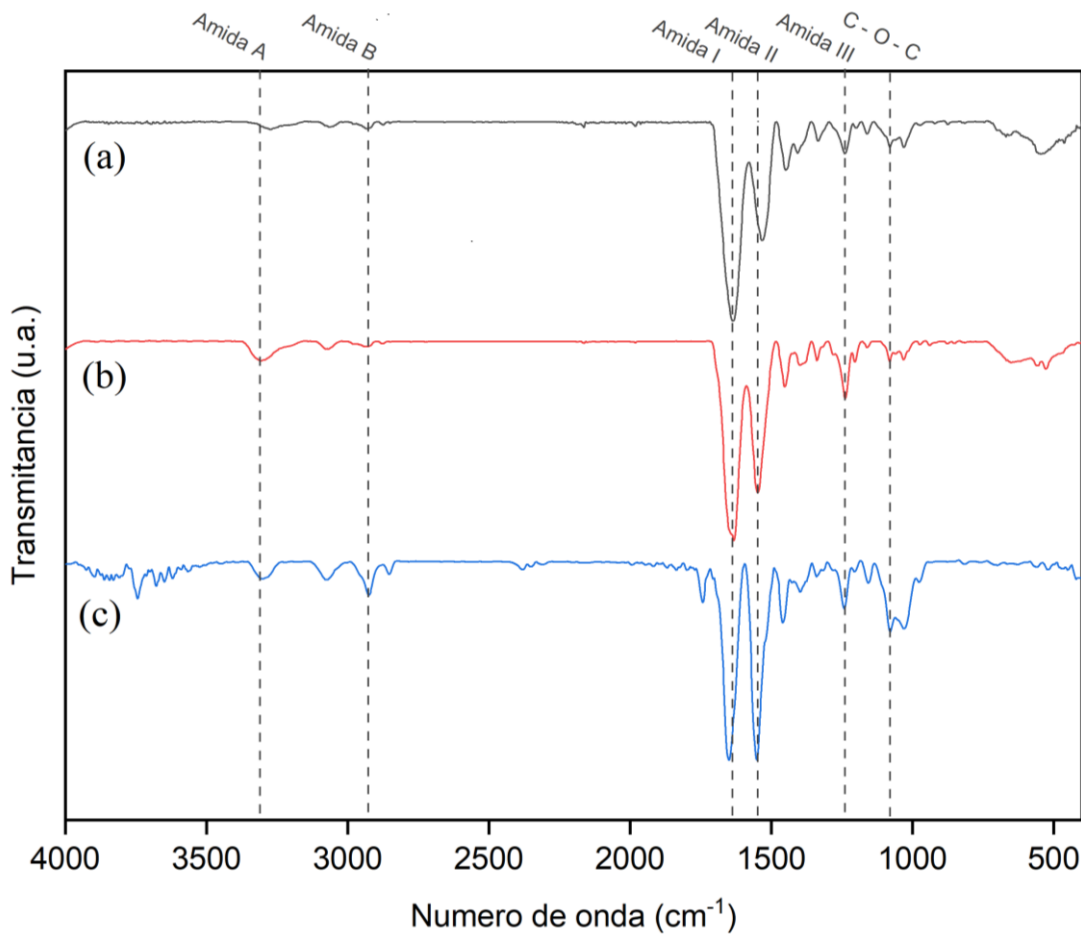
Além disso, é possível observar que não houve alterações de massa de 120 até 200 °C. Entre as temperaturas de 250 e 550 °C, ocorre a completa desnaturação do polímero e o pico observado em 560 °C é associado à carbonização do polímero (DURAIPANDY et al., 2015).

#### 5.1.2.2 Análise estrutural (FTIR)

Considerando que a análise térmica identificou que a temperatura de desnaturação do colágeno é de aproximadamente 37°C, isso ressalta a sensibilidade deste biomaterial às variações de temperatura. Portanto, entender como diferentes métodos de secagem afetam suas propriedades é fundamental para garantir a manutenção de sua estrutura e funcionalidade. Para a verificação da estrutura do colágeno após os diferentes processos de secagem, foi utilizada a análise de FTIR. A Figura 20 mostra o espectro dos colágenos obtidos por diferentes métodos de secagem. Todas as bandas características de Amida A, B, I, II e III estão presentes nos colágenos obtidos pelos 3 métodos de secagem, demonstrando que o método de secagem não interfere na pureza.

Contudo, é possível observar uma diferença entre os colágenos (a) e (b), em contraste com (c), mais notavelmente nas bandas associadas à Amida II e C-O-C; isto pode estar associado à habilidade de auto-montagem (*self-assembly*) do colágeno, visto que essa amostra foi deixada para secar em um dessecador com vácuo por diversos dias em temperatura ambiente. A diferença em intensidade indica o grau de integridade da tripla hélice (GEORGE; VEIS, 1991). Logo, é possível assumir que a amostra seca no dessecador tem um maior grau de organização em comparação com as outras amostras; em contraste, a amostra seca no forno tem picos mais espaçados e menores intensidades, que podem estar associados com a desnaturação térmica do colágeno e à ruptura da tripla hélice característica do colágeno em peptídeos menores (AL-SAIDI et al., 2012).

Figura 20 FTIR das amostras de colágeno secas por diferentes métodos, (a) estufa, (b) liofilizado e (c) dessecador.



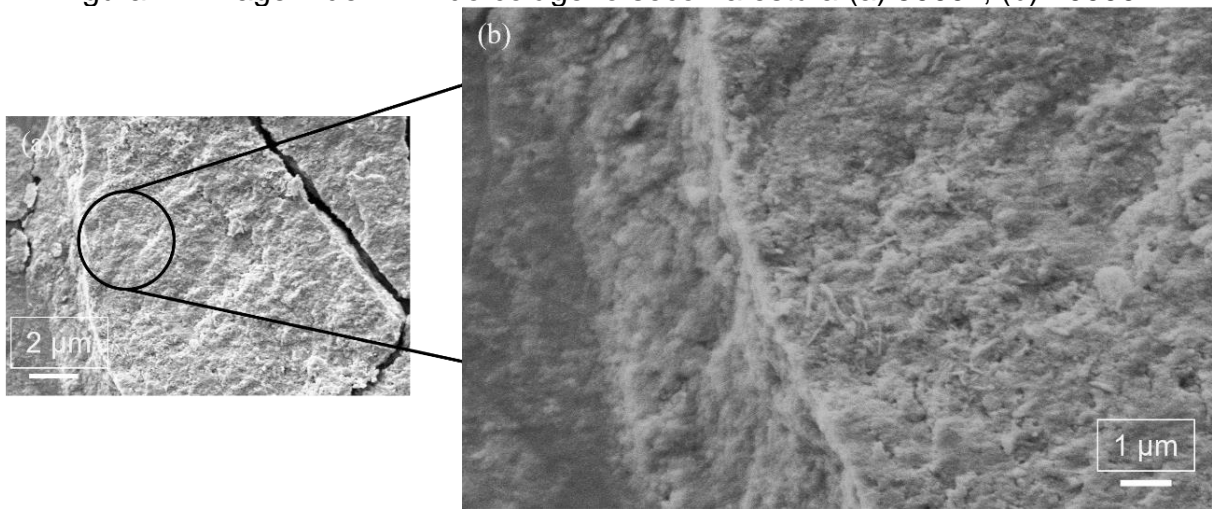
Fonte: Do autor (2024).

Desta forma, o colágeno liofilizado foi selecionado para as posteriores análises, visto que a estufa danifica a estrutura do colágeno e a secagem com o dessecador não demonstrou boa capacidade de retirar umidade das amostras, fator que não permitiu a obtenção de uma solução adequada para a eletrofiação.

### 5.1.2.3 Análise morfológica e microestrutural: MEV

Para avaliar as possíveis mudanças estruturais indicadas pelo FTIR, a análise de MEV foi realizada. Ela permite a avaliação da condição estrutural do colágeno, contribuindo de forma significativa para a seleção do método de secagem adequado para diferentes aplicações, como biomateriais e produtos cosméticos. A análise de MEV mostra microestruturas distintas para cada amostra. A Figura 21 mostra a micrografia do colágeno seco na estufa.

Figura 21 Imagem de MEV do colágeno seco na estufa (a) 5000x, (b) 10000x.

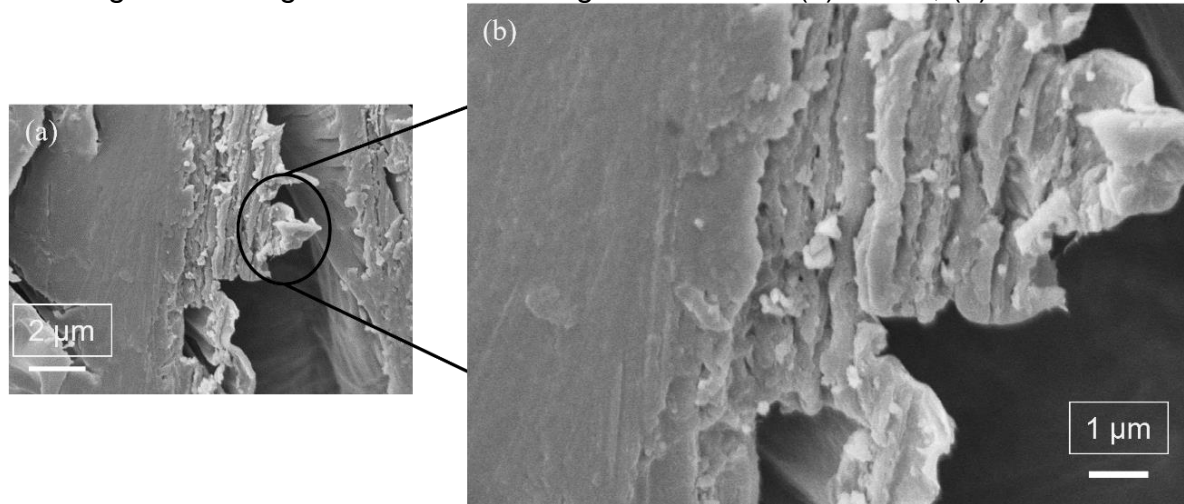


Fonte: Do autor (2024).

É possível observar uma estrutura amorfa, um fenômeno ligado com a desnaturação da integridade da tripla hélice do colágeno, como confirmado pelas análises de FTIR e DSC. A presença de uma estrutura amorfa pode ser associada à perda da estrutura organizacional do colágeno, resultando em um aspecto morfológico diferente das amostras secas no dessecador e no liofilizador. A amostra, após a secagem, se mostrou aderente ao toque, indicando uma mudança de fase da estrutura para uma gelatina com uma baixa umidade residual (EL-MELIGY et al., 2022). Esta mudança estrutural pode ter implicações significativas, especialmente em aplicações biomédicas, onde a preservação da estrutura nativa do colágeno é crucial para a efetividade do colágeno.

Por outro lado, a Figura 22 mostra microscopia da amostra de colágeno liofilizado.

Figura 22 Imagem de MEV do colágeno liofilizado (a) 5000x, (b) 10000x.

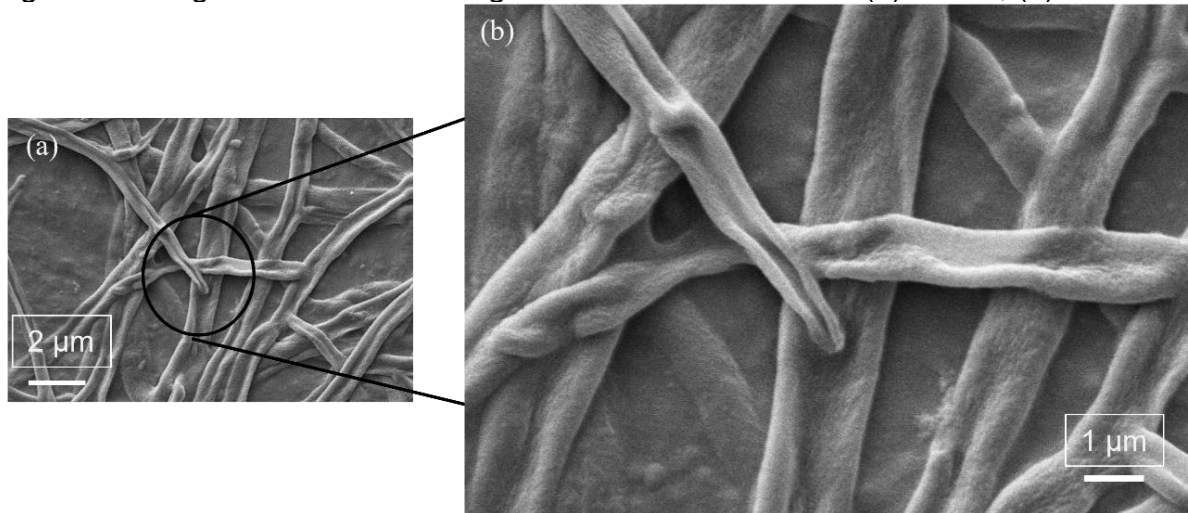


Fonte: Do autor (2024).

É notável que a amostra consiste em diversas camadas e finas linhas, as quais estão associadas com o método de secagem utilizado. A principal vantagem da liofilização é a habilidade de remover água e umidade da amostra sem causar danos irreversíveis à sua estrutura (SCHUETZ et al., 2013). A preservação da estrutura é fundamental, especialmente em aplicações onde manter a organização tridimensional do colágeno é essencial, como em biomateriais para regeneração. A amostra liofilizada apresenta um aspecto de algodão e é extremamente higroscópica. A alta higroscopicidade da amostra liofilizada indica sua alta capacidade de absorção de água, uma propriedade desejável em aspectos biomédicos, onde a interação com fluidos corpóreos é comum. Essa característica pode contribuir para a efetividade de biomateriais derivados de colágeno, como um curativo, na regeneração de tecidos e na engenharia de tecidos, onde a resposta de hidratação pode ser benéfica.

Por sua vez, a amostra seca no dessecador demonstrou uma estrutura fibrosa distinta e característica do colágeno, apresentando fibras com aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de espessura. A Figura 23 mostra as estruturas obtidas. Estas estruturas são compostas de numerosas fibrilas de colágeno, que possuem um papel fundamental na estruturação e composição da ECM do corpo humano (LU et al., 2011; SUN, 2021; ZHANG; LIU; ZHANG, 2021). O dessecador, por remover lentamente a umidade e manter a amostra na presença de apenas uma pequena concentração de água, demonstrou a habilidade única do colágeno de se auto-estruturar.

Figura 23 Imagem de MEV do colágeno seco no dessecador (a) 5000x, (b) 10000x.



Fonte: Do autor (2024).

Esse resultado é particularmente interessante, já que destaca a capacidade intrínseca do colágeno de preservar sua organização e estrutura mesmo em ambientes de baixa umidade. A preservação da estrutura fibrosa observada na amostra seca no dessecador é crucial em aplicações biomédicas, onde a arquitetura tridimensional do colágeno tem um papel fundamental na interação com células e tecidos. Além disso, essa característica pode ser vantajosa em regeneração tecidual e processos da engenharia de tecidos, onde a habilidade de se auto-estruturar (*self assembly*) pode auxiliar na incorporação do colágeno em diferentes ambientes biológicos.

Apesar de apresentar resultados muito interessantes, é importante notar que o colágeno seco em dessecador requer vários dias para secar completamente, o que pode diminuir a eficiência e a viabilidade da produção de membranas eletrofiadas. No entanto, pode ser uma opção viável quando se deseja uma forma diretamente aplicável do colágeno.

Diante desses resultados, a liofilização foi selecionada como método de secagem para a obtenção da solução de colágeno para eletrofição, uma vez que preservou a estrutura tridimensional da molécula de colágeno sem danificá-la, além de apresentar uma extração de água mais eficiente e rápida em comparação com a secagem no dessecador.

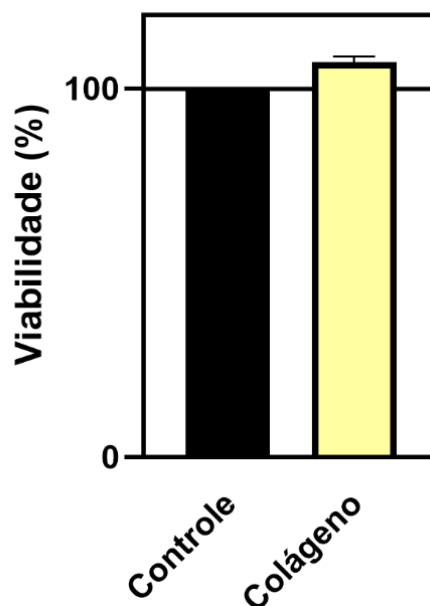
### 5.1.3 Avaliações integradas de resposta celular do colágeno

Como demonstrado pela análise de FTIR, os colágenos liofilizados não apresentaram diferenças significativas entre si, o mesmo foi observado nos testes de citotoxicidade e migração celular, desta forma, a fim de diminuir o erro e aumentar o número de testagens, os colágenos x, w, z1, z2, y e k foram condensados e tratados apenas como colágeno. Os valores de viabilidade e migração celular foram avaliados estatisticamente com o auxílio do *software* GraphPad Prism, todas as amostras demonstraram valores estatisticamente significativos em relação ao controle, com valores de p inferiores a 0,005.

#### 5.1.3.1 Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade visa demonstrar o efeito do biomaterial quando em contato com células *in vitro*. Os resultados obtidos dos colágenos após contato com fibroblastos por 72 h são expressos abaixo na Figura 24.

Figura 24 Viabilidade celular dos colágenos liofilizados



Fonte: Do autor, 2024

Como é observado no gráfico, após o colágeno permanecer por 72 h em contato com as células, apresentou uma viabilidade média de 107 %, provando não ser citotóxico, além disso, isso pode servir como um indicativo do potencial que o colágeno tem de proliferação celular. Essa característica é altamente desejável em diversos contextos, especialmente em curativos funcionais destinados à regeneração de tecidos.

O colágeno tipo I já é comercializado, como é o caso das membranas, BioGide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) e a Mucograft® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), por conta da sua alta viabilidade e a capacidade de adesão de células, ele é indispensável em cirurgias de regeneração guiada de tecidos e ossos como um curativo intraepitelial (WILLERSHAUSEN et al., 2014).

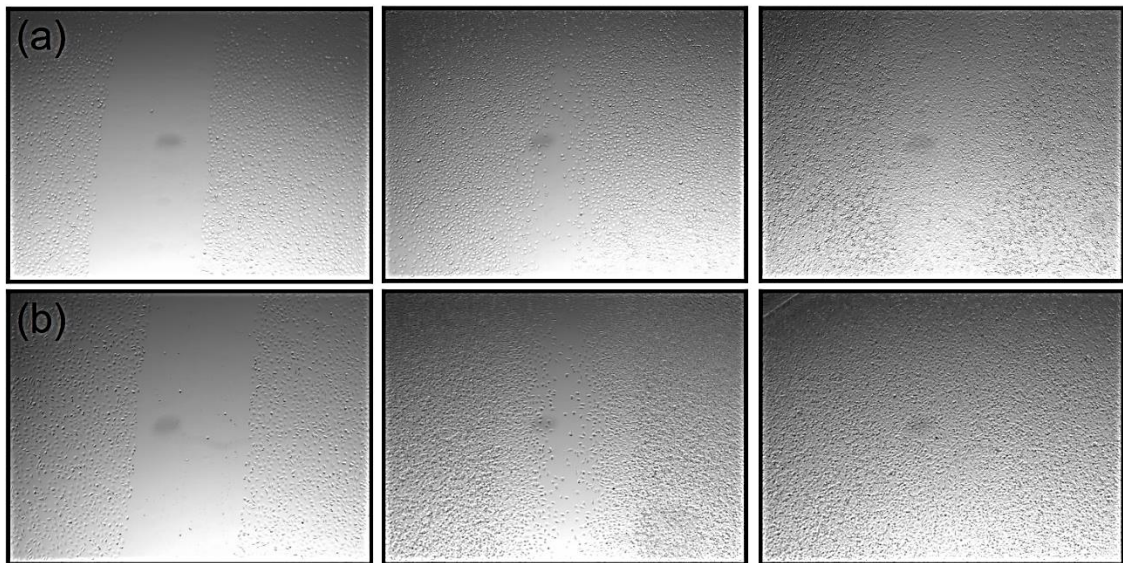
#### 5.1.3.2 Migração celular

O ensaio de *scratch* serve como um indicativo de migração celular em contato com o biomaterial. O teste de *scratch*, aliado com o teste de citotoxicidade, avaliam aspectos importantes para a avaliação de propriedades importantes como adesão e proliferação celular. A Figura 25 mostra os resultados obtidos.

O tempo 0 corresponde ao momento imediatamente após a adição do colágeno ou apenas o meio DMEM no caso do controle. No tempo 24 h já é possível notar uma densidade celular aumentada no poço que contém colágeno quando comparado ao controle. Após 48 h, os poços com colágeno apresentaram toda área do arranhão ocupada por fibroblastos com uma alta densidade de células. Apesar do grupo controle apresentar fechamento de toda a área, a densidade celular é muito menor.

Esse padrão pode ser atribuído aos efeitos quimiotáticos do colágeno, que são capazes de estimular a migração celular. Além disso, os resíduos de aminoácidos presentes no colágeno podem atuar como nutrientes essenciais para o crescimento e proliferação celular, contribuindo para a migração celular eficiente (FELICIAN et al., 2019).

Figura 25 Micrografias de Scratch nos tempos de 0, 24 e 48 h: (a) Controle, (b) colágeno.



Fonte: Do autor, 2024.

Esses resultados sugerem que o colágeno de Tilápia obtido não apenas é biocompatível, como também possui propriedades que promovem a migração celular, o que é essencial para a regeneração eficaz de tecidos. A capacidade do colágeno de estimular a migração celular pode ser particularmente relevante em contextos de reparo tecidual, onde a mobilidade celular é crucial para o fechamento de feridas e a formação de tecido cicatricial saudável.

## 5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS ELETROFIADAS COM COLÁGENO

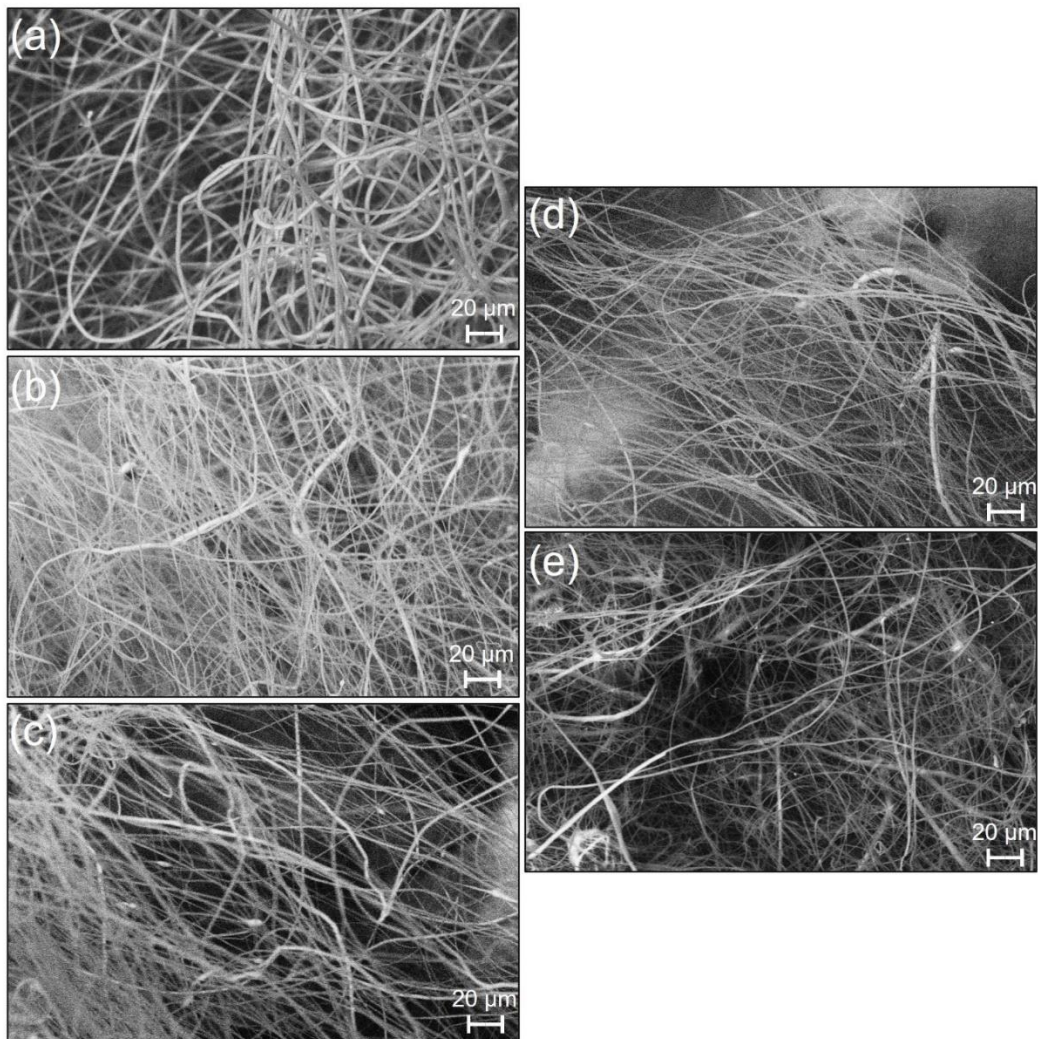
Após a caracterização abrangente do colágeno, avaliando suas propriedades físicas, químicas e biológicas, o próximo passo deste estudo é a obtenção e caracterização de membranas eletrofiadas contendo colágeno. Esta etapa é essencial para entender o impacto do colágeno nas propriedades das membranas eletrofiadas, bem como para explorar seu potencial como curativo funcional.

## 5.2.1 Influência da adição do colágeno extraído da pele de Tilápia em membranas eletrofiadas

### 5.2.1.1 Caracterização morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com a finalidade de se identificar a influência da adição do colágeno na morfologia das fibras a fim de identificar o potencial para aplicações em curativos funcionais e regeneração tecidual, foi realizada uma análise de MEV. A Figura 26 apresenta as imagens obtidas.

Figura 26 Micrografias das membranas, (a) PPuro, (b) P 9010, (c) P 8020, (d) PCol 9010 e (e) PCol 8020. Aumento de 1000x



Fonte: Do autor (2024).

Observa-se que todas as membranas, demonstraram poucos defeitos, e fibras com um formato cilíndrico. Além disso, é notável a presença de um grau alinhamento das membranas. Isto pode ser atribuído a velocidade do coletor. Membranas alinhadas possuem melhor resistência mecânica na direção do alinhamento, em relação as fibras desalinhadas. Além disso o alinhamento da membrana pode influenciar em propriedades como orientação, migração e diferenciação celular (WINARNI; SUNENGSIH; GINANJAR, 2021), características desejadas em diversos curativos funcionais.

O diâmetro das fibras é apresentado na Tabela 4 e teve alteração com a adição de ácido acético e também de colágeno. As membranas obtidas apresentam valores de diâmetro de fibra entre 3,13 e 1,24  $\mu\text{m}$ , diminuindo com o aumento da concentração de ácido acético e de colágeno.

Tabela 4 Diâmetro de fio, densidade real, densidade aparente e porosidade das fibras.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro das fibras (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Densidade real (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>	<b>Densidade aparente (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>	<b>Porosidade (%)</b>
P puro	3,13 $\pm$ 0,58	1,49 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,01	87,4
P 9010	2,79 $\pm$ 0,25	1,84 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,01	88,9
P 8020	1,98 $\pm$ 0,89	1,70 $\pm$ 0,12	0,19 $\pm$ 0,01	88,9
Pcol 9010	1,62 $\pm$ 0,37	1,58 $\pm$ 0,12	0,11 $\pm$ 0,01	87,6
Pcol 8020	1,24 $\pm$ 0,61	1,60 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,01	87,8

Fonte: Do autor (2024).

O ácido acético possui o ponto de ebulição maior que o clorofórmio, fator que altera a morfologia das fibras. Além disso, o ácido acético possui maior condutividade elétrica e maior constante dielétrica em relação ao clorofórmio. Soluções com condutividades elétricas e constantes dielétricas maiores, tendem a formar fios mais finos (CHAI; WU, 2013; LUO; STRIDE; EDIRISINGHE, 2012). Esse fenômeno, associado às propriedades específicas dos solventes e à interação com o colágeno, contribui para as variações no diâmetro das fibras. As fibras obtidas mostram valores diferentes de diâmetro, ainda que com os parâmetros de eletrofiliação mantidos constantes.

Vale salientar que fibras com diâmetro de fios médio de 1  $\mu\text{m}$  indicam melhores resultados de crescimento e diferenciação de células, em relação as fibras

com maior diâmetro. Este resultado é atribuído ao fato das fibras, por conta do seu baixo diâmetro, permitirem a adesão cruzada de células entre as fibras adjacentes, o que contribui para a adesão, a propagação e a proliferação celular (GU et al., 2023; HERRERO-HERRERO et al., 2021a). Além disso, curativos de PLA com diâmetro de fibra de 1  $\mu\text{m}$  representam uma melhor capacidade de regeneração de animais e uma alta capacidade de servirem como carregadores de fármacos, em virtude da dissolução do PLA em contato com o corpo humano (BI et al., 2020b; BINOTTO et al., 2020).

A biocompatibilidade de um biomaterial pode ser definida como a habilidade de um material de acionar localmente e orientar as proteínas e células do hospedeiro em direção a uma reconstrução vascularizada e integração funcional do tecido (CRAWFORD et al., 2021). A porosidade do biomaterial possibilita funções como a migração e a integração celular, que usualmente são associadas a maior biocompatibilidade (HERNANDEZ; WOODROW, 2022). Além disso, a porosidade de membranas tem um papel fundamental na entrada e saída de nutrientes e é preferível estar em valores entre 50 a 90% (TOLEDO et al., 2021).

A porosidade das membranas também é apresentada na Tabela 4 e se manteve praticamente constante em todas as membranas, com valores que variam de 87,4 a 88,9%. Esta alta porosidade está associada com a técnica de confecção das membranas e com os diâmetros de fios obtidos. A porosidade melhora a resposta de cura e diminui o crescimento de tecido cicatricial, dando melhor aparência e funcionalidade ao tecido recuperado (FUKANO et al., 2010; GARG et al., 2013). Além disso, a alta porosidade implica em maior área superficial do material: materiais com maior razão entre área superficial e volume podem promover melhor adesão celular (GARG; GOYAL, 2014; RNJAK-KOVACINA; WEISS, 2011).

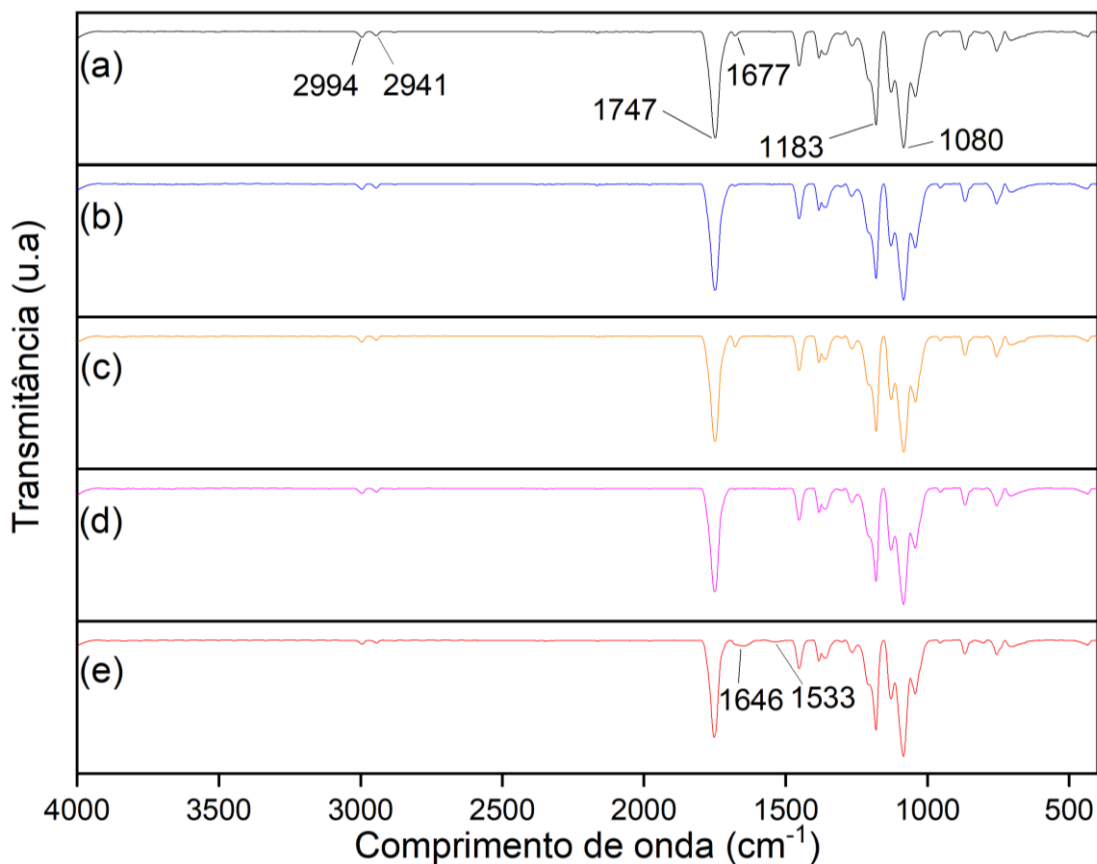
#### 5.2.1.2 Análise estrutural: FTIR

A interação entre PLA e o colágeno pode ser observado no espectro do FTIR. Quando dois ou mais polímeros formam blendas imiscíveis, não há alterações significativas no espectro do FTIR em relação a cada componente individual. Contudo, se os polímeros apresentam compatibilidade entre si, o espectro demonstra

diferenças como, uma mudança no comprimento da onda, ou da intensidade, ou um alargamento da banda (MA; YU; WANG, 2006).

A Figura 27 mostra os espectros de FTIR obtidos das amostras com apenas o PLA e as blendas de PCol. As bandas entre 2994–2941  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à vibração de estiramento dos grupos funcionais C-H<sub>3</sub> e C-H, respectivamente. A banda encontrada em 1747  $\text{cm}^{-1}$  e 1677  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento da ligação C=O. As bandas pronunciadas em 1183 e 1080  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à vibração de estiramento do grupo funcional C-O-C (CUI et al., 2015; RAMOS et al., 2014; RÂPĂ et al., 2020). Além disso, é possível observar que a adição de ácido acético nas amostras não alterou de forma significativa os espectros de FTIR, indicando que o solvente não alterou a forma cristalina do polímero (MEAURIO; LÓPEZ-RODRÍGUEZ; SARASUA, 2006). Estes valores encontrados estão em coerência com outros espectros de FTIR de PLA puro encontrados na literatura.

Figura 27 Espectro de FTIR das membranas, onde, (a) P puro, (b) P 9010, (c) P 8020, (d) Pcol 9010 e (e) Pcol 8020.



Fonte: Do autor (2024).

Nas amostras Pcol 9010 e Pcol 8020, é possível verificar a existência de duas bandas distintas em  $1647$  e  $1533\text{ cm}^{-1}$ . Valores bem similares foram encontrados nas amostras de colágeno liofilizadas e correspondem à vibração de estiramento da amida N-H (CUI et al., 2015); além disso, a vibração é mais evidente na amostra Pcol 8020, indicando que as amostras, de fato, possuem colágeno em sua composição. Essas observações levam à conclusão de que o PLA e o colágeno liofilizado são imiscíveis entre si.

### 5.2.1.3 Molhabilidade das membranas

A análise de ângulo de contato permite avaliar a molhabilidade das membranas por meio da interação da membrana com um líquido, neste caso com a água. A Figura 28 ilustra os valores de ângulo de contato obtidos das amostras PPuro, P 9010, P 8020, PCol 9010 e PCol 8020, quando uma gota de água foi depositada sobre a superfície.



Fonte: Do autor (2024).

É possível verificar que as fibras com maior quantidade de colágeno obtiveram maiores valores de ângulo de contato em relação as que não continham. Quando o ângulo de contato atinge valores superiores a  $90^\circ$ , o material pode ser considerado hidrofóbico; as membranas apresentaram valores que variam entre  $97,4$  e  $116,9^\circ$ ; logo, todas as membranas podem ser caracterizadas como hidrofóbicas.

Em superfícies ásperas, a água tem dificuldade em penetrar no material; além disso, em materiais fibrosos, a gota de água está sendo suportada por uma superfície com fibras muito finas e a alta porosidade das membranas pode dificultar ainda mais a molhabilidade das membranas. Ainda, durante o processo de *electrospinning*, grupos de menor energia de ligação podem se concentrar na superfície da fibra, fator que aumenta a hidrofobicidade (CUI et al., 2008). Vários estudos indicam que superfícies eletrofiadas possuem um ângulo de contato maior que o mesmo material em forma de filme (MA et al., 2005; WANG; WANG, 2012).

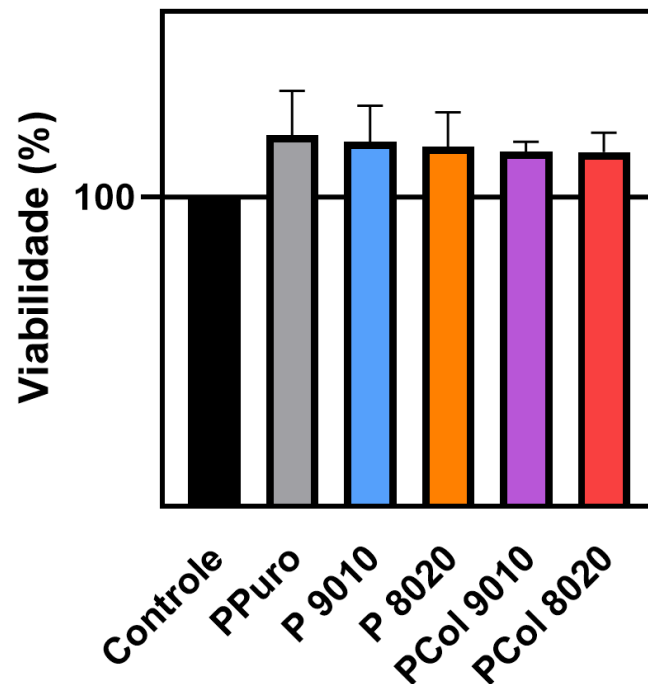
Usualmente, células têm preferência por adesão em curativos hidrofílicos devido a sua natureza; contudo, o colágeno promove maior adesão, sobrevivência e proliferação de células (SOMAIHA et al., 2015). O colágeno é um biomaterial com uma superfície muito ativa. Isso é devido ao seu caráter anfifílico e polianfílico, além da sua estrutura de baixa entropia (DUPONT-GILLAIN, 2014) e, como ele é responsável pela estruturação da ECM, as células possuem extrema afinidade com colágeno, devido a esta proteína conter sítios específicos de ligação que acomodam as células (JOKINEN et al., 2004). Vale salientar que superfícies hidrofóbicas favorecem a estabilidade de proteínas no biomaterial (PACE et al., 2011).

## **5.2.2 Avaliações integradas de resposta celular das membranas**

### **5.2.2.1 Viabilidade Celular**

Para avaliação da citotoxicidade das membranas, foi realizado um teste de viabilidade celular com Alamar Blue com fibroblastos (Figura 29). Por meio da análise estatística ANOVA unidirecional, todas as amostras demonstraram significância em relação ao controle, com  $p$  inferior a 0,005.

Figura 29 Viabilidade Celular das membranas.



Fonte: Do autor (2024).

Por meio desse ensaio, foi possível observar que nenhuma membrana demonstrou potencial citotoxicidade aos fibroblastos. É importante notar que todas as membranas obtidas influenciaram de forma positiva a proliferação de células no meio de cultivo. Esse resultado pode estar associado à semelhança que as membranas possuem em relação a ECM; além disso, tamanho de fibra adequado e porosidade também são fatores que podem alterar a morfologia e a viabilidade celular da membrana (CUI et al., 2015; HERRERO-HERRERO et al., 2021). Além disso, outros trabalhos também expõem o potencial do PLA como um curativo para regeneração de tecidos (BI et al., 2020a; HERRERO-HERRERO et al., 2021).

#### 5.2.2.2 Migração celular

Após a constatação de que as membranas não demonstraram potencial citotóxico, mas, ao contrário, promoveram uma proliferação celular favorável, ensaios de *Scratch* foram conduzidos também para as membranas. Esses ensaios são fundamentais para avaliar a capacidade de migração celular em resposta à presença das membranas eletrofiadas contendo colágeno extraído da pele de Tilápia. Neste

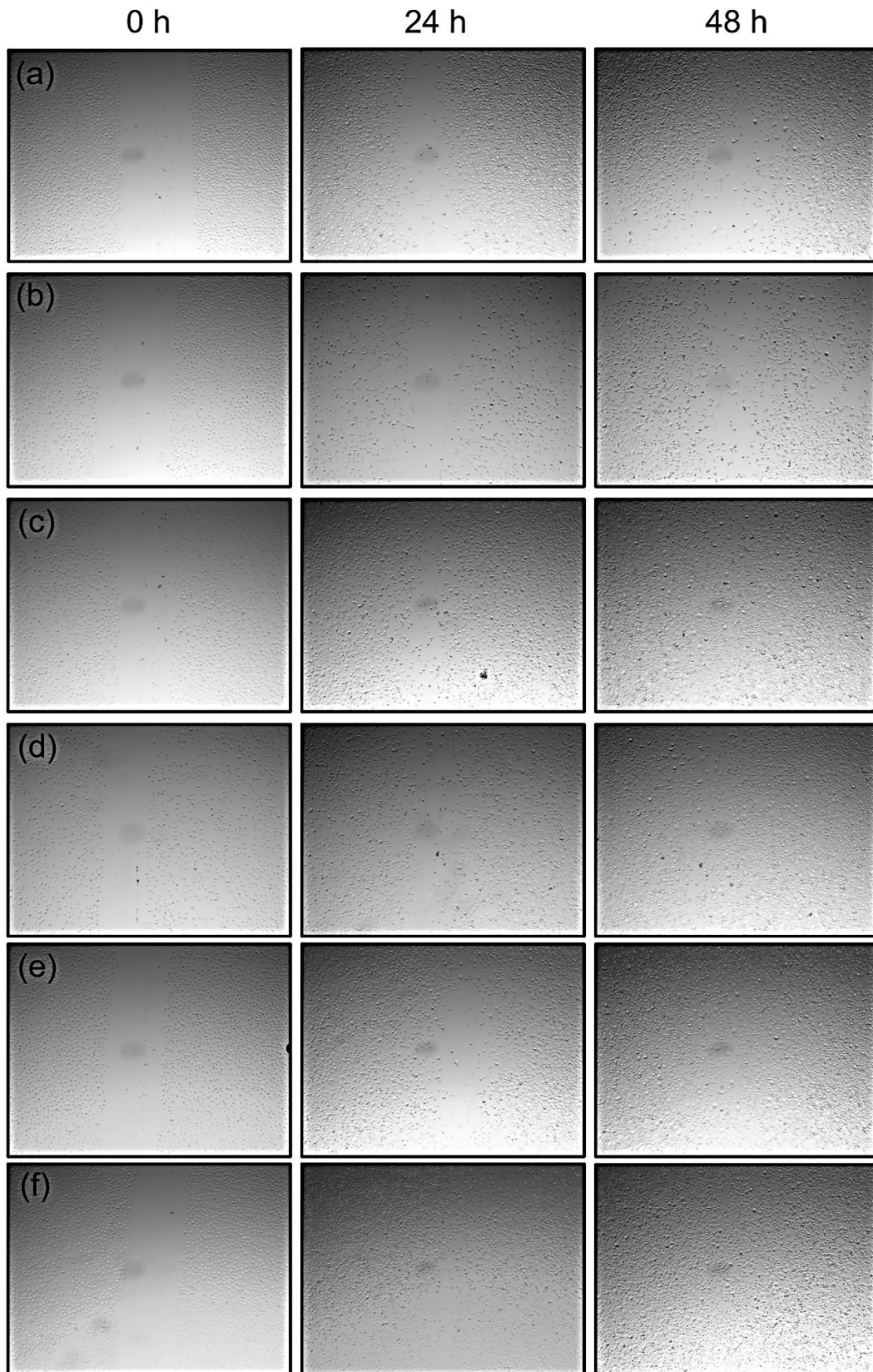
ensaio, as células são cultivadas em um poço e é realizado um risco de tamanho padrão, com o objetivo de imitar um ferimento (ILINA; FRIEDL, 2009). A Figura 30 mostra os resultados obtidos do teste de *Scratch* das células de fibroblastos em contato com as membranas nos tempos de 0, 24 e 48 h.

Nas imagens, é possível observar os riscos de tamanho padrão no tempo de 0 h e a migração das células após 24 e 48 h. Após 24 h, todas as amostras em contato com as membranas demonstraram um fechamento de até 50% da área inicial em relação ao tempo de 0 h. Em contraste, o grupo controle, contendo apenas o meio DMEM, exibiu um fechamento de apenas 32%.

Após 48 h, com exceção da membrana Ppuro e do controle, todas as amostras demonstraram o completo fechamento do arranhão. Curiosamente, as membranas P 9010 e P 8020 produzidas com ácido acético, mas sem colágeno, obtiveram um fechamento de arranhão maior que o controle e que o PPuro. Isso se deve ao menor tamanho de fibra, já que o diâmetro de fibra interfere diretamente na capacidade de adesão e proliferação celular. Desta forma, foi observado que os menores diâmetros de fio obtiveram os melhores resultados de migração celular. Além disso, os poços contendo as membranas com colágeno apresentaram uma densidade celular visivelmente maior que todas as demais amostras, principalmente a amostra PCol8020, revelando uma potencial capacidade de auxiliar na regeneração de tecidos da membrana com adição de colágeno.

Em conjunto, os resultados dos ensaios de *Scratch* reforçam a viabilidade das membranas eletrofiadas como biomateriais para aplicações biomédicas, especialmente na regeneração de tecidos danificados. A capacidade dessas membranas em promover a migração celular é um indicativo importante de sua eficácia na facilitação do processo de cicatrização e reparo tecidual.

Figura 30 Micrografias de *Scratch* nos tempos de 0, 24 e 48 h: (a) Controle, (b) PPuro, (c) P 9010, (d) P 8020, (e) PCol 9010 e (f) PCol 8020.



Fonte: Do autor (2024).

## CONCLUSÃO

Colágeno tipo I de alta pureza foi obtido com sucesso de pele de tilápias por meio do método ASC. A análise de FTIR mostrou as bandas características do colágeno tipo I. A análise de SDS revelou a presença das duas bandas características da molécula de colágeno  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , além disso foi possível observar a presença de outras duas bandas,  $\beta$  e  $\gamma$ , referentes a configuração nativa da proteína. Os resultados de FTIR e SDS-PAGE validam que o método ASC pode ser usado para extrair colágeno tipo I com elevada pureza. As variáveis tempo de contato com ácido e tempo de purificação foram analisadas com o objetivo de otimizar o processo. Os resultados indicam que o maior tempo de diálise, juntamente com um maior tempo de contato com o ácido, provem os maiores valores de rendimento, enquanto a pureza se manteve constante em todos os testes realizados. Além disso, foi avaliada a morfologia do colágeno em 3 métodos diferentes de secagem. Cada um destes demonstrou características diferentes, que podem ser aproveitados por diversas outras áreas do conhecimento.

Membranas com estruturas que simulam a matriz extracelular também foram obtidas por meio da técnica de eletrofiliação. Além disso, foi possível incorporar o colágeno nas matrizes destas fibras. As análises morfológicas indicam um tamanho de fio que variou entre 3,13 e 1,24  $\mu\text{m}$ , com uma porosidade de aproximadamente 90% em todas as membranas. Os resultados de ângulo de contato das membranas com água mostraram que a adição de colágeno tornou as membranas mais hidrofóbicas com valores que variam de 97 a 116°. A análise de FTIR demonstrou que o colágeno foi incorporado com sucesso na matriz da membrana, por meio das bandas de ligação do grupo amida em 1647 e 1533  $\text{cm}^{-1}$ .

Com o fim de avaliar o potencial desta membrana como um curativo, foram realizados testes de citotoxicidade e migração celular. Os resultados de citotoxicidade indicaram que as membranas não possuem potencial de citotoxicidade, mas sim a potencialidade de auxiliar na proliferação das células com um aumento de até 20% da proliferação em relação ao controle. Além disso, a análise de *Scratch* evidenciou que todas as membranas, com exceção da Ppuro, obtiveram resultados satisfatórios, com pelo menos 1 dos poços de cultivo completamente povoados de células após 48 h de contato.

Com isso é possível afirmar que as membranas produzidas têm potencial uso como curativos funcionais para regeneração de feridas. Contudo, mais estudos devem ser realizados, especialmente em espécimes vivos, para fim de melhor identificar os potenciais das membranas.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a viabilidade econômica do colágeno de tilápia
- Realizar experimentos em modelos animais para avaliar o desempenho das membranas eletrofiadas contendo colágeno na regeneração de feridas cutâneas.
- Investigar a biodegradabilidade das membranas ao longo do tempo, tanto in vitro quanto in vivo para entender a durabilidade das membranas e seu potencial de integração com o tecido hospedeiro.
- Explorar a possibilidade de incorporar fármacos, agentes antimicrobianos ou agentes terapêuticos nas membranas eletrofiadas para possibilitar a liberação controlada de substâncias bioativas durante o processo de cicatrização.

## REFERÊNCIAS

- LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487–492, 2004.
- AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 817–824, jun. 2010.
- AHMED, M.; VERMA, A. K.; PATEL, R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 18, p. 100315, 1 dez. 2020.
- AHMED, R. et al. Application of bacterial collagenolytic proteases for the extraction of type I collagen from the skin of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). **LWT**, v. 89, p. 44–51, 1 mar. 2018.
- ALKIAYAT, M. A Practical Guide to Creating a Pareto Chart as a Quality Improvement Tool. **Global Journal on Quality and Safety in Healthcare**, v. 4, n. 2, p. 83, 1 maio 2021.
- AL-SAIDI et al. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (*Lithrinus microdon*) skin: effects of extraction conditions. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, p. 1167–1173, 2012.
- ALVEN, S. et al. Polymer-Based Wound Dressing Materials Loaded with Bioactive Agents: Potential Materials for the Treatment of Diabetic Wounds. **Polymers**, v. 14, n. 4, 1 fev. 2022.
- ANDREW, S. M.; TITUS, J. A.; ZUMSTEIN, L. Dialysis and Concentration of Protein Solutions. **Current Protocols in Toxicology**, v. 10, n. 1, p. A.3H.1-A.3H.5, 1 nov. 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. Anuário Peixe BR da piscicultura. **PEIXE BR**, 2022.
- ATEF, M. et al. Biochemical and structural characterization of sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. e13256, 1 ago. 2020a.
- ATEF, M. et al. Biochemical and structural characterization of sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. e13256, 1 ago. 2020b.

- BAE, I. et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 49–54, 1 maio 2008.
- BI, H. et al. In Vitro and In Vivo Comparison Study of Electrospun PLA and PLA/PVA/SA Fiber Membranes for Wound Healing. **Polymers 2020, Vol. 12, Page 839**, v. 12, n. 4, p. 839, 6 abr. 2020a.
- BI, H. et al. In Vitro and In Vivo Comparison Study of Electrospun PLA and PLA/PVA/SA Fiber Membranes for Wound Healing. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 839, 6 abr. 2020b.
- BINOTTO, J. P. et al. Poly (Lactic Acid) membrane and Sedum dendroideum extract favors the repair of burns in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 35, n. 3, 2020.
- BISCHOF, J. C.; HE, X. Thermal Stability of Proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, n. 1, p. 12–33, 1 mar. 2006.
- BLANCO, M. et al. Collagen Extraction Optimization from the Skin of the Small-Spotted Catshark (*S. canicula*) by Response Surface Methodology. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 9 jan. 2019.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., jun. 2006.
- CAO, S. et al. Characteristics comparison of collagens from squid skin by different extraction methods. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e69422, 17 out. 2022.
- CHAI, J.-H.; WU, Q.-S. Electrospinning preparation and electrical and biological properties of ferrocene/poly(vinylpyrrolidone) composite nanofibers. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 4, p. 189–197, 14 mar. 2013.
- CHEN, H. L. et al. Polylactic Acid-Based Biomaterials in Wound Healing: A Systematic Review. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 36, n. 9, 1 set. 2023.
- CHEN, K. et al. Recent advances in electrospun nanofibers for wound dressing. **European Polymer Journal**, v. 178, p. 111490, 5 set. 2022.
- COELHO, R. C. G. et al. Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 787–795, 1 set. 2017.
- COMMISSION, E. et al. **Assessment of the implementation of Directive 2000/53/EU on end-of-life vehicles (the ELV Directive) with emphasis on the end of life vehicles of unknown whereabouts – Under the Framework Contract – Assistance to the Commission on technical, socio-economic and cost benefit**

**assessments related to the implementation and further development of EU waste legislation.** [s.l.] Publications Office, 2018.

CONN, R. E. et al. Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 273–283, 1 abr. 1995.

CRAWFORD, L. et al. Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration. **Advanced healthcare materials**, v. 10, n. 11, p. e2002153, 1 jun. 2021.

CUI, M. et al. Preparation, Cell Compatibility and Degradability of Collagen-Modified Poly(lactic acid). **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 595–607, 5 jan. 2015.

CUI, W. et al. Degradation patterns and surface wettability of electrospun fibrous mats. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 3, p. 731–738, 1 mar. 2008.

DE CAMPOS VIDAL, B. The Use of a Complex of Collagen Type I with Hydroxyapatite from Bone, as a Bone Implant Substitute: An Experimental Approach. <https://home.liebertpub.com/ten>, v. 2, n. 2, p. 151–160, 4 jan. 2007.

DE OLIVEIRA, A. C. S.; BORGES, S. V. Poli (Ácido Lático) Aplicado para Embalagens de Alimentos: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 15, n. 1, 2020.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. **BioMedicine**, v. 5, n. 4, p. 24–28, 1 dez. 2015.

DOMENEK, S.; COURGNEAU, C.; DUCRUET, V. Characteristics and Applications of Poly(lactide). **Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications**, p. 183–223, 26 set. 2011.

DUAN, R. et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 702–706, 1 fev. 2009.

DUPONT-GILLAIN, C. C. Understanding and controlling type I collagen adsorption and assembly at interfaces, and application to cell engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 124, p. 87–96, 1 dez. 2014.

DURAI PANDY, N. et al. Plumbagin caged silver nanoparticle stabilized collagen scaffold for wound dressing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 7, p. 1415–1425, 2015.

EL-MELIGY, M. A. et al. Preparation and Physicochemical Characterization of Gelatin–Aldehyde Derivatives. **Molecules**, v. 27, n. 20, 1 out. 2022.

- FATTAHI, F. S.; KHODDAMI, A.; AVINC, O. O. Poly(Lactic Acid) Nano Structure Mats as Potential Wound Dressings. **Pamukkale University Journal of Engineering Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1193–1203, 2020.
- FELICIAN, F. F. et al. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 5, p. e1700557, 1 maio 2018.
- FELICIAN, F. F. et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 22, n. 1, p. 12–20, fev. 2019.
- FUKANO, Y. et al. Epidermal and dermal integration into sphere-templated porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) implants in mice. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 94, n. 4, p. 1172, 9 set. 2010.
- GAJBHIYE, S.; WAIRKAR, S. Collagen fabricated delivery systems for wound healing: A new roadmap. **Biomaterials Advances**, v. 142, p. 213152, 1 nov. 2022.
- GARG, K. et al. MACROPHAGE FUNCTIONAL POLARIZATION (M1/M2) IN RESPONSE TO VARYING FIBER AND PORE DIMENSIONS OF ELECTROSPUN SCAFFOLDS. **Biomaterials**, v. 34, n. 18, p. 4439, jun. 2013.
- GARG, T.; GOYAL, A. K. Biomaterial-based scaffolds--current status and future directions. **Expert opinion on drug delivery**, v. 11, n. 5, p. 767–789, 2014.
- GELITA. **Gelita Improving Quality of Life**. Disponível em: <<https://www.gelita.com/pt-pt>>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- GELNEX. **Gelnex Saúde, bem-estar e beleza**. Disponível em: <<https://www.gelnex.com.br/pt/>>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- GEORGE, A.; VEIS, A. FTIRS in water demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2372–2377, 1 mar. 1991.
- GHOMI, E. R. et al. Collagen-based biomaterials for biomedical applications. **J Biomed Mater Res**, v. 109, p. 12, 2021.
- GJERDE, B. et al. Quantitative genetics of body weight, fillet weight and fillet yield in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 342–343, n. 1, p. 117–124, 15 abr. 2012.
- GÓMEZ, L. J. et al. In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates. **Food Research International**, v. 120, p. 52–61, jun. 2019.

- GU, Z. et al. Fiber diameters and parallel patterns: proliferation and osteogenesis of stem cells. **Regenerative Biomaterials**, v. 10, 17 jan. 2023.
- HARRIS, M. et al. Developments for Collagen Hydrolysate in Biological, Biochemical, and Biomedical Domains: A Comprehensive Review. **Materials**, v. 14, n. 11, 1 jun. 2021.
- HERNANDEZ, J. L.; WOODROW, K. A. Medical Applications of Porous Biomaterials: Features of Porosity and Tissue-Specific Implications for Biocompatibility. **Advanced Healthcare Materials**, v. 11, n. 9, 19 maio 2022.
- HERNÁNDEZ-RANGEL, A.; MARTIN-MARTINEZ, E. S. Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 9, p. 1751–1764, 1 set. 2021.
- HERRERO-HERRERO, M. et al. Influence of chemistry and fiber diameter of electrospun PLA, PCL and their blend membranes, intended as cell supports, on their biological behavior. **Polymer Testing**, v. 103, p. 107364, nov. 2021a.
- HERRERO-HERRERO, M. et al. Influence of chemistry and fiber diameter of electrospun PLA, PCL and their blend membranes, intended as cell supports, on their biological behavior. **Polymer Testing**, v. 103, p. 107364, 1 nov. 2021b.
- HEU, M. S. et al. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 27–33, 28 fev. 2010.
- HORBAN, M. A. et al. PRODUÇÃO DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) A PARTIR DO SORO DO LEITE. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1136–1150, 20 set. 2017.
- HOSSEINI RAVANDI, S. A. et al. **Recently developed electrospinning methods: a review. Textile Research Journal** SAGE Publications Ltd, , 2022.
- HOU, N.-T.; CHEN, B.-H.; JEN, F. Extraction, purification and characterization of collagen peptide prepared from skin hydrolysate of sturgeon fish. **Food Quality and Safety**, v. 7, p. 1–15, 2023.
- HUO, P. et al. Electrospun Nanofibers of Polycaprolactone/Collagen as a Sustained-Release Drug Delivery System for Artemisinin. **Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 1228**, v. 13, n. 8, p. 1228, 9 ago. 2021.
- ILINA, O.; FRIEDL, P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 18, p. 3203–3208, 15 set. 2009.

- JAFARI, H. et al. Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. **Polymers** **2020**, Vol. **12**, Page **2230**, v. 12, n. 10, p. 2230, 28 set. 2020.
- JOKINEN, J. et al. Integrin-mediated Cell Adhesion to Type I Collagen Fibrils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31956–31963, 23 jul. 2004.
- KOSKI, A.; YIM, K.; SHIVKUMAR, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. **Materials Letters**, v. 58, n. 3–4, p. 493–497, 1 jan. 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** **1970** **227:5259**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAMERS, E. et al. The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. **European cells & materials**, v. 20, p. 329–343, 2010.
- LAW, J. X. et al. Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 14, n. 6, p. 699, 1 dez. 2017a.
- LAW, J. X. et al. **Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine** Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society, , 1 dez. 2017b.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1–2, p. 1–22, 19 jun. 2001a.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1–2, p. 1–22, 19 jun. 2001b.
- LI, W.-J.; SHANTI, R. M.; TUAN, R. S. Electrospinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. 2006.
- LIMA, T. DE P. DE L.; PASSOS, M. F. Skin wounds, the healing process, and hydrogel-based wound dressings: a short review. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 32, n. 14, p. 1910–1925, 2021.
- LIU, H. et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC Advances**, v. 8, n. 14, p. 7533–7549, 16 fev. 2018.
- LIU, J. et al. A new cyanoacrylate-poly(lactic acid)-based system for a wound dressing with on-demand removal. **Materials Letters**, v. 293, p. 129666, 15 jun. 2021a.
- LIU, X. et al. Electrospun Medicated Nanofibers for Wound Healing: Review. **Membranes**, v. 11, n. 10, 1 out. 2021b.

- LOPEZ-OJEDA, W. et al. Anatomy, Skin (Integument). **StatPearls**, 17 out. 2022.
- LU, P. et al. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, dez. 2011.
- LUO, C. J.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions. **Macromolecules**, v. 45, n. 11, p. 4669–4680, 12 jun. 2012.
- MA, X.; YU, J.; WANG, N. Compatibility characterization of poly(lactic acid)/poly(propylene carbonate) blends. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 44, n. 1, p. 94–101, 10 jan. 2006.
- MA, Z. et al. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2527–2536, 1 maio 2005.
- MAURER, T. et al. Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0205027, 1 out. 2018.
- MCPHERSON, J. M.; SAWAMURA, S.; ARMSTRONG, R. An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 93–107, 1 jan. 1986.
- MEAURIO, E.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, N.; SARASUA, J. R. Infrared Spectrum of Poly(L-lactide): Application to Crystallinity Studies. **Macromolecules**, v. 39, n. 26, p. 9291–9301, 1 dez. 2006.
- MERCANTE, L. A.; CORRÊA, D. S. **Eletrofição e nanofibras: fundamentos e aplicações**. [s.l.] Atena Editora, 2023.
- MONG, T. et al. Characterization of Acid-Soluble Collagen from Food Processing By-Products of Snakehead Fish (*Channa striata*). **Processes 2021, Vol. 9, Page 1188**, v. 9, n. 7, p. 1188, 8 jul. 2021.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. A review of “Applied Statistics and Probability for Engineers” Douglas C. Montgomery, George C. Runger, 1994 New York, Chichester, John Wiley and Sons ISBN 0 471 01021 9. **EUROPEAN JOURNAL OF ENGINEERING EDUCATION**, v. 19, n. 3, p. 383, 1 jan. 1994.
- MOTA, F. A. S.; COSTA FILHO, J. T.; BARRETO, G. A. The Nile tilapia viscera oil extraction for biodiesel production in Brazil: An economic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 108, p. 1–10, 1 jul. 2019.

- MUHAMMED, A. et al. Extraction and Characterisation of Collagen from the Skin of Golden Carp (*Probarbus Jullieni*), a Processing By-Product. v. 9, p. 783–791, 2018.
- MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 3, p. 405–417, 1 set. 2017.
- NAKAYAMA, K. In Vitro Biofabrication of Tissues and Organs. **Biofabrication**, p. 1, 2013.
- NARAYANAN, G. et al. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 107, p. 247, 12 dez. 2016.
- NEUMANN, P. M.; ZUR, B.; EHRENREICH, Y. Gelatin-based sprayable foam as a skin substitute. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 15, n. 1, p. 9–18, 1 jan. 1981.
- NILSUWAN, K. et al. Salmon Skin Acid-Soluble Collagen Produced by A Simplified Recovery Process: Yield, Compositions, and Molecular Characteristics. **Fishes 2022, Vol. 7, Page 330**, v. 7, n. 6, p. 330, 11 nov. 2022.
- ØDEGAARD, K. S.; TORGERSEN, J.; ELVERUM, C. W. Structural and Biomedical Properties of Common Additively Manufactured Biomaterials: A Concise Review. **Metals 2020, Vol. 10, Page 1677**, v. 10, n. 12, p. 1677, 15 dez. 2020.
- OECHSLE, A. M. et al. Microstructure and physical-chemical properties of chicken collagen. **Food Structure**, v. 7, p. 29–37, 1 jan. 2016.
- OSLAN, S. N. H. et al. Characterization of Acid- and Pepsin-Soluble Collagen Extracted from the Skin of Purple-Spotted Bigeye Snapper. **Gels**, v. 8, n. 10, 1 out. 2022.
- PACE, C. N. et al. Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability. **Journal of molecular biology**, v. 408, n. 3, p. 514, 5 maio 2011.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863, 2010.
- PARVIZI, J.; KIM, G. K. Collagen. **High Yield Orthopaedics**, p. 107–109, 1 jan. 2010.
- POWELL, H. M.; BOYCE, S. T. Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. **Tissue Engineering, Part A: Tissue Engineering**, v. 15, n. 8, p. 2177–2188, 1 ago. 2009.

- RAMOS, M. et al. Influence of thymol and silver nanoparticles on the degradation of poly(lactic acid) based nanocomposites: Thermal and morphological properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 158–165, out. 2014.
- RÂPĂ, M. et al. Development of Bionanocomposites Based on PLA, Collagen and AgNPs and Characterization of Their Stability and In Vitro Biocompatibility. **Applied Sciences**, v. 10, n. 7, p. 2265, 26 mar. 2020.
- RATNER, B. D. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. [s.l.] Academic Press, 2013.
- RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–19, jan. 2011.
- RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells 2019, Vol. 8, Page 607**, v. 8, n. 6, p. 607, 18 jun. 2019.
- RNJAK-KOVACINA, J.; WEISS, A. S. Increasing the pore size of electrospun scaffolds. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 17, n. 5, p. 365–372, 1 out. 2011.
- SAI K., P.; BABU, M. Collagen based dressings — a review. **Burns**, v. 26, n. 1, p. 54–62, 1 fev. 2000.
- SAVENCU, I. et al. Review of advances in polymeric wound dressing films. **Reactive and Functional Polymers**, v. 168, p. 105059, 1 nov. 2021.
- SCHUETZ, T. et al. The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 118–125, 1 jan. 2013.
- SHRIVASTAV, A. et al. In vivo models for assesment of wound healing potential: A systematic review. **Wound Medicine**, v. 20, p. 43–53, 1 mar. 2018.
- SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J. et al. Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 65–70, 1 jul. 2014.
- SLOMKOWSKI, S.; PENCZEK, S.; DUDA, A. Polylactides—an overview. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 25, n. 5, p. 436–447, 1 maio 2014.
- SOMIAH, C. et al. Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.
- SONG, Z. et al. Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the Nile tilapia by fermentation and chemical pretreatment. **Food Chemistry**, v. 340, p. 128139, 15 mar. 2021.

- SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 1 fev. 2017.
- SOUZA, R. V.; SILVA, B. C.; NOVAES, A. L. T. **A aquicultura de Santa Catarina em números**. Santa Catarina: [s.n.].
- STOJANOV, S.; BERLEC, A. Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 130, 25 fev. 2020.
- SUN, B. The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. **Cell Reports Physical Science**, v. 2, n. 8, 18 ago. 2021.
- TENG, S. H. et al. Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. **Materials Letters**, v. 62, n. 17–18, p. 3055–3058, 30 jun. 2008.
- The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. [s.l.] FAO, 2022.
- TOLEDO, A. L. M. M. et al. Effect of three different amines on the surface properties of electrospun polycaprolactone mats. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 70, n. 17, p. 1258–1270, 22 nov. 2021.
- TOTTOLI, E. M. et al. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 1–30, 1 ago. 2020.
- TYLER, B. et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163–175, 15 dez. 2016.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. <http://dx.doi.org/10.1177/147323000903700531>, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 1 out. 2009.
- WANG, C.; WANG, M. Dual-source dual-power electrospinning and characteristics of multifunctional scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 10, p. 2381–2397, 17 out. 2012.
- WANG, M. et al. Artificial Skin Perception. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 33, n. 19, 1 maio 2021.
- WANG, Z. et al. Improvement of skin condition by oral administration of collagen hydrolysates in chronologically aged mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 2721–2726, 9 jul. 2017.

- WILLERSHAUSEN, I. et al. Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: in vitro and in vivo evidence. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 1, p. 29–37, 2014.
- WINARNI, S.; SUNENGSIH, N.; GINANJAR, I. Multi responses taguchi optimization using overlaid contour plot and desirability function. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1776, p. 12061, 2021.
- XU, S. et al. Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) skin through improved pretreatment methods. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. S141–S153, 18 dez. 2017.
- XUE, J. et al. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. **Chemical reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298, 4 abr. 2019.
- YANG, J. et al. Novel Modification of Collagen: Realizing Desired Water Solubility and Thermostability in a Conflict-Free Way. **ACS Omega**, v. 5, n. 11, p. 5772–5780, 24 mar. 2020.
- YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. **StatPearls**, 14 nov. 2022.
- ZAIN, N. M.; SAIDIN, S.; SOSIAWAN, A. Properties of Tilapia Collagen as a Biomaterial for Tissue Engineering: A Review. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 932, n. 1, p. 012021, 1 set. 2020.
- ZENG, S.-K. et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). [s.d.].
- ZEUGOLIS, D. I. et al. Collagen solubility testing, a quality assurance step for reproducible electro-spun nano-fibre fabrication. A technical note. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 19, n. 10, p. 1307–1317, 1 out. 2008.
- ZHANG, J. et al. Structural characterization, in-vivo acute systemic toxicity assessment and in-vitro intestinal absorption properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin acid and pepsin solubilized type I collagen. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2017–2025, 1 dez. 2016.
- ZHANG, W.; LIU, Y.; ZHANG, H. Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development. **Cell & Bioscience 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 31 mar. 2021.
- ZHANG, X. et al. Advances in wound dressing based on electrospinning nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 141, n. 1, p. e54746, 5 jan. 2024.

ZHANG, X.; WILLIAMS, D. F. **Definitions of biomaterials for the Twenty-First Century: Proceedings of a Consensus Conference held in Chengdu, People's Republic of China, June 11th and 12th 2018, organized under the auspices of the International Union of Societies for Biomaterials Sci.** [s.l: s.n.].

ZHAO, R. et al. Inflammation in Chronic Wounds. **International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 2085**, v. 17, n. 12, p. 2085, 11 dez. 2016.