

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*):
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA FORMULAÇÃO DE HIDROGÉIS
PARA MEDICINA REGENERATIVA**

Marco Antônio Justino

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, agosto de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

MARCO ANTÔNIO JUSTINO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DE PELE DE TILÁPIA
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*):
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA FORMULAÇÃO DE HIDROGÉIS
PARA MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Materiais.

Profa. Dra. Rosane Michele Duarte Soares

Orientadora

Prof. Dr. Douglas Gamba

Coorientador

Porto Alegre, agosto de 2021

A presente dissertação foi realizada interamente pelo autor, exceto às colaborações das quais foram devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (março/2017) e (maio/2021), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a orientação da Prof. Dra. Rosane Michele Duarte Soares e co-orientação do Prof. Dr. Douglas Gamba. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais pela seguinte banca examinadora.

Comissão examinadora:

Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

Profa. Dra. Naira Balzaretto

Profa. Dra. Rosane Michele Duarte Soares

CIP - Catalogação na Publicação

Justino, Marco Antônio

Extração e caracterização de colágeno de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*): avaliação do seu potencial na formulação de hidrogéis para medicina regenerativa / Marco Antônio Justino. -- 2021. 114 f.

Orientadora: Rosane Michele Duarte Soares.

Coorientador: Douglas Gamba.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Biomateriais. 2. Colágeno. 3. Hidrogel. 4. Extração. 5. Medicina regenerativa. I. Soares, Rosane Michele Duarte, orient. II. Gamba, Douglas, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Silvano e Gremilda, por todo apoio e suporte emocional, e por segurarem as pontas financeiramente para que eu pudesse terminar o trabalho, sempre me incentivando a continuar e fazer o meu melhor.

Aos meus amigos por todos os momentos de descontração durante esse período turbulento e, em especial ao Rafael Brito e Daniel Walfrid, por me acolherem como um membro de sua família em momentos de solidão e isolamento, me ajudando gradualmente a me recuperar.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, especialmente Jéssica Petry e Juliana Isidoro, pelos incontáveis *insights* na pesquisa e por me ensinarem muito que eu aprendi durante o mestrado.

À minha orientadora, Rosane Michele Duarte Soares, pela confiança depositada em mim e no trabalho realizado, sempre disposta em ajudar e por sempre manter a serenidade quando eu me sentia desesperado e incrédulo com a pesquisa. Ao meu coorientador, Douglas Gamba, por acreditar no projeto e ceder a dependências do laboratório para que o mesmo pudesse ser realizado.

Ao professor Dr. Daniel Marinowic e seu aluno de doutorado Felipe Valla Fortes Rodrigues do Instituto do Cérebro-RS, por realizarem os ensaios biológicos dos hidrogéis.

Aos demais pesquisadores que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização do trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À CAPES pela bolsa de estudo.

“You could spend a life wondering what lies at the other end of the track. Or you could go find out. It hurts to let someone go. But sometimes leaving is necessary.”
- Off The Road, Unravel

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	PROTEÍNAS	17
2.1.1	Aminoácidos	17
2.1.2	Estrutura Proteica	19
2.1.3	Proteínas Globulares e Fibrosas	22
2.1.4	Colágeno	24
2.1.5	Extração de Colágeno	25
2.1.6	Purificação de Proteínas	31
2.1.7	Aplicações do Colágeno	36
2.2	HIDROGÉIS	38
2.2.1	Tipos de reticulação	39
2.2.2	Composição Polimérica	40
2.2.3	Métodos de preparação	41
2.2.4	Matéria Prima	45
2.2.5	Aplicações de Hidrogéis	48
2.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS	52
2.3.1	Adesão Celular	53
2.3.2	Citotoxicidade	56
3	OBJETIVO GERAL	59
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1	MATERIAIS	60
4.2	MÉTODOS	60
4.2.1	Extração do Colágeno	60

4.2.2	Purificação do Colágeno.....	61
4.2.3	Funcionalização do PEG com Grupos Metacrilatos (PEG-MA)	63
4.2.4	Preparo dos Hidrogéis	63
4.3	CARACTERIZAÇÃO	64
4.3.1	Caracterizações do Colágeno.....	64
4.3.2	Caracterização do PEG-MA	66
4.3.3	Caracterizações dos Hidrogéis	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	EXTRAÇÃO DO COLÁGENO	68
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	72
5.1.2	Eletroforese (SDS-PAGE)	74
5.1.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	76
5.1.4	Análise Termogravimétrica (TGA)	77
5.1.5	Infravermelho (FTIR-ATR).....	78
5.2	FUNCIONALIZAÇÃO DO PEG	80
5.3	CARACTERIZAÇÕES DOS HIDROGÉIS	81
5.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	81
5.3.2	Análise Termogravimétrica (TGA)	84
5.3.3	Grau de Intumescimento (GI)	86
5.3.4	Infravermelho (FTIR-ATR).....	88
5.3.5	Ensaio Biológicos.....	90
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8	APÊNDICE	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química genérica de um aminoácido.	17
Figura 2: Reação entre os aminoácidos alanina (Ala) e glicina (Gli).	19
Figura 3: Conformações proteicas (a) estrutura primária, (b) estrutura secundária (c) estrutura terciária e (d) estrutura quaternária. Imagem tirada e adaptada da referência [1].	21
Figura 4: Estrutura fibrilar do colágeno e seus subdomínios. Imagem retirada da referência [7].	25
Figura 5: Número de patentes depositadas sobre extração de colágeno. Fonte <i>Derwent Innovations Index</i> , pesquisa realizada em fevereiro de 2021.	28
Figura 6: Infográfico dos produtos de peptídeos de colágeno da empresa GELITA™. Imagem tirada da fonte [43].	30
Figura 7: Célula de eletroforese à esquerda e, à direita, resultado da separação das proteínas após à adição do corante ao gel. Imagem retirada da referência [1].	35
Figura 8: Número de artigos publicados com assunto "colágeno" e suas respectivas áreas de interesse. Pesquisa realizada em abril de 2021.	37
Figura 9: Representação de hidrogéis reticulados quimicamente (esquerda) e fisicamente (direita).	40
Figura 10: Redes semi-interpenetrante (esquerda) e interpenetrante (direita) dos hidrogéis.	41
Figura 11: Esquema de interações de grupos -COO- com contra íon Ca ²⁺ . Imagem retirada e adaptada da referência [100].	42
Figura 12: Ligação de hidrogênio entre grupos carboxílicos dos polímeros. Imagem adaptada da referência [100].	42
Figura 13: Esquema de interação iônica em um hidrogel polieletrólítico. Imagem retirada e adaptada da referência [100].	43
Figura 14: Hidrogel de poli(álcool vinílico) (PVA) formado pela adição do agente reticulante glutaraldeído. Imagem adaptada da referência [100].	43
Figura 15: Etapas de uma reação de polimerização radicalar.	45
Figura 16: Reação enzimática de desacetilação da quitina.	46
Figura 17: Estrutura química da unidade repetitiva do polietilenoglicol.	48

Figura 18: Cinética de intumescimento de hidrogéis. Imagem tirada da referência [120].	49
Figura 19: Esquema mostrando a bioconjugação entre o scaffold com as células em um hidrogel. Imagem retirada e adaptada da referência [113].	50
Figura 20: Representação esquemática da formação do sistema ECM-Integrina-Citoesqueleto em sítios de adesão focal. Imagem retirada da referência [136].	55
Figura 21: Reação de redução de um sal tetrazólio genérico em formazan, composto de coloração roxa, mostrado à esquerda. A tonalidade da cor indica a quantidade de células em cada poço, visto que maior a quantidade de células, mais escuro será sua tonalidade.....	58
Figura 22: Etapas de extração e purificação do colágeno da pele de tilápia. (A) Pré-tratamento da pele de tilápia com NaOH 0,1 mol L ⁻¹ ; (B) Peles de tilápia após pré-tratamento com NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e HCl 0,4 mol L ⁻¹ ; (C) Extração do colágeno com HAc 0,5 mol L ⁻¹ ; (D) Precipitado de colágeno; (E) Diálise contra água mili-Q do precipitado de colágeno solubilizado em HAc 0,5 mol L ⁻¹ ; (F) Liofilização da solução de colágeno após diálise.	62
Figura 23: Fluxograma de extração e purificação do colágeno de pele de tilápia.	63
Figura 24: Pele de tilápia (a) antes do pré-tratamento, (b) após pré-tratamento em NaCl 1 mol L ⁻¹ e HCl 0,5 mol L ⁻¹ , (c) após pré-tratamento em NaOH 0,5 mol L ⁻¹ e (d) comparativo do enchimento das peles tratadas em solução alcalina à esquerda e, solução salina e ácida à direita.....	70
Figura 25: Imagem do colágeno seco das amostras (a) ASC4.3 e (b) ASC5.1.	72
Figura 26: Fotomicrografia de MEV para amostras de colágeno purificados de ASC4.3, ASC4.4 e ASC5.1 (a, b, c) à magnificação 40x, (d, e, f) 2000x e (g, h, i) 5000x.	73
Figura 27: Eletroforese de amostras de colágeno purificadas à concentração de 2 mol L ⁻¹ de (ASC0 à ASC2.2) cloreto de sódio e (ASC3.1 à ASC4.2) sulfato de amônio.	74
Figura 28: Eletroforese de amostras de colágeno purificadas com 0,9 mol L ⁻¹ de cloreto de sódio e sulfato de amônio.....	75

Figura 29: Termograma de DSC de uma amostra de colágeno liofilizada e posteriormente solubilizada em HAc 50 mM, seguida pela estabilização à 10 °C por 48 h.	76
Figura 30: Termograma de TGA/DTGA dos colágenos liofilizados.	77
Figura 31: Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) das amostras de colágeno liofilizados.	79
Figura 32: Reação de funcionalização do PEG com anidrido metacrílico.	80
Figura 33: Espectro de RMN de ¹ H do PEG-MA em CDCl ₃	81
Figura 34: Fotomicrografia de MEV para os sistemas de hidrogéis (a,b) PEG/Q, (c,d) PEG/Q-2C-10I, (e,f) PEG/Q-6C-10I, (g,h) PEG/Q-2C-15I e (i,j) PEG/Q-6C-15I.	83
Figura 35: Termograma de TGA de amostras de hidrogéis preparados com (a) 10 mmol e (b) 15 mmol do sistema de iniciadores.	85
Figura 36: Grau de intumescimento em função do tempo das sistemas de hidrogéis contendo PEG/Q e PEG/Q-C utilizando (a) 10 mmol e (b) 15 mmol do sistema de iniciadores TEMED e PSP.	87
Figura 37: Espectro de infravermelho de hidrogéis contendo PEG, quitosana, colágeno e utilizando (a) 10 mmol e (b) 15 mmol dos iniciadores TEMED e PSP.	89
Figura 38: Adesão celular dos sistemas de hidrogéis em uma linhagem de células VERO em 6 h e 12 h.	91
Figura 39: Viabilidade celular por MTT dos hidrogéis em linhagem de células VERO em (a) 6 h, (b) 12 h.	93
Figura 40: Análise do potencial de membrana mitocondrial por JC-1 dos hidrogéis em linhagem de células VERO em (a) 6 h, (b) 12 h e (c) comparativo entre os tempos os tempos de análise.	94
Figura 41: Espectro de dicroísmo circular de duas soluções-mãe de colágeno: ASC2.2 e ASC5.1.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas fibrosas intracelulares e extracelulares e suas funções. ...	23
Tabela 2: Comparativo entre os processos de extração de subprodutos de animais marinhos e mamíferos.	31
Tabela 3: Funções do colágeno em áreas diversas.	37
Tabela 4: Composição dos hidrogéis em 1 mL de solução com diferentes proporções de colágeno, ativador e iniciador.	64
Tabela 5: Parâmetros observados após pré-tratamento das peles em solução alcalina de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , solução salina de NaCl 1 mol L ⁻¹ e posterior tratamento em solução de HCl 0,5 mol L ⁻¹	70
Tabela 6: Parâmetros de purificação das soluções ácidas e caracterizações realizadas.	71
Tabela 7: Atribuição dos sinais do espectro de infravermelho do colágeno extraído da pele de tilápia.	79
Tabela 8: Atribuição dos sinais dos espectros de infravermelho dos sistemas de hidrogéis.	88
Tabela 9: Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento para os hidrogéis com diferentes quantidades de colágeno depois de 20 h.	113

ABREVIATURAS

AIF - *Apoptosis inducing factor*.

ASC - *Acid-Solubilized Collagen*.

ATP - Adenosina trifosfato.

C - Colágeno

CDCl₃ - Clorofórmio deuterado.

Q - Quitosana.

DAPI - Dihidrocloreto de 4',6-Diamidino-2-fenilindole.

DC - Dicroísmo Circular.

DMEM - *Dulbecco's modified eagle médium*.

DMSO - Dimetil sulfóxido.

DNA - *Deoxyribonucleic acid*.

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*.

FTIR-ATR - *Fourier Transformed Infrared - Attenuated Total Reflectance*.

GI - Grau de Intumescimento

HAc - Ácido acético.

IPN - *Interpenetrating Polymer Network*.

JC-1 - 5,5',6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetil benzimidazolilcarbocianine iodeto.

MBA - N,N-Metileno-bisacrilamida.

MEC - Matriz Extracelular.

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura.

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2–5-diphenyltetrazolium bromide*.

NSSC - *Neutral Salt-Solubilized Collagen*.

PEG-DBA - Poli(etileno glicol) dibutiraldeído.

PEG-MA – Poli(etileno glicol)-dimetacrilato.

PHEMA - Poli(metacrilato de 2-hidroxietila).

PSP - Persulfato de Potássio.

PSC - *Pepsin-Solubilized Collagen*.

PVA - Poli(alcool vinílico).

RMN - Ressonância Magnética Nuclear.

RNA - *Ribonucleic acid*.

BSS – Bissulfito de sódio.

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis*.

SPT – Solução de pré-tratamento.

TACF - Teste adjuvante completo de Freund.

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

TGA - *Thermogravimetric Analysis*.

THF - Tetrahydrofurano

TMS - Tetrametilsilano

RESUMO

Neste estudo, colágeno tipo I foi extraído de pele do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*), com base em sua solubilidade em ácido acético (HAc). Para extração, a pele foi previamente tratada em solução de cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio (NaOH). Foi observado que as peles tratadas em NaOH apresentaram maior solubilidade em HAc e resultaram em uma solução mais viscosa. O colágeno solúvel em HAc foi então purificado por *salting-out* utilizando NaCl e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) à 2 mol L⁻¹ e 0,9 mol L⁻¹. Houve precipitação do colágeno I em ambas as concentrações, no entanto, em concentrações salinas mais elevadas houve precipitação de outras proteínas, o que foi possível ser comprovado pelo perfil de SDS-PAGE das amostras. O colágeno extraído foi caracterizado por análises de DSC e TGA a fim de determinar a temperatura de desnaturação e temperatura máxima de degradação, respectivamente. A caracterização química e estrutural foi determinada por FTIR-ATR e Dicroísmo Circular. Posteriormente, o colágeno extraído foi empregado na formulação de hidrogéis utilizando poli(etileno glicol) (PEG) e quitosana (Q). Para isso, o PEG foi primeiramente funcionalizado com grupos reticuláveis através da reação com anidrido metacrílico. A funcionalização pode ser confirmada pela análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H). Foram preparados hidrogéis contendo PEG/Q e hidrogéis contendo PEG/Q-Col em duas concentrações diferentes de colágeno, 2 mg mL⁻¹ e 6 mg mL⁻¹. Os hidrogéis foram reticulados utilizando persulfato de potássio (PSP) como iniciador e *N,N,N',N'*-tetraetilenodiamina (TEMED) como ativador, em duas quantidades diferentes, 10 mmol e 15 mmol, resultando em 6 diferentes sistemas de hidrogéis. A presença do colágeno pode ser comprovada através dos espectros FTIR-ATR, sendo a sua inserção ao hidrogel resulta em uma redução do grau de intumescimento. Os ensaios biológicos realizados mostraram que os hidrogéis elaborados não apresentaram toxicidade à célula e podem servir como substrato para adesão celular.

Palavras-chave: Colágeno, PEG, quitosana, hidrogel, biomateriais, engenharia de tecidos.

ABSTRACT

In the present work, collagen type I was extracted and isolated from tilapia's skin (*Oreochromis niloticus*) using acetic acid. In order to extract said protein, the raw material was previously pre-treated with sodium chloride and sodium hydroxide to evaluate which would further assist the extraction. It could be observed that skins treated with sodium chloride showed greater solubility in acetic acid thus resulting on a higher yield of acid solution. The acid solution was further salted-out with sodium chloride and ammonium sulfate to concentrations of 2 mg mL^{-1} and $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$. It was observed that collagen proteins were isolated on both concentrations salt, whereas higher concentrations also showed proteins other than collagen type I, which can be observed by SDS-PAGE. Calorimetric techniques were used to determine undernature e degradation temperatures. Also, CD and FTIR-ATR were used to further analyse the chemical structure of the protein. The isolated collagen was used to prepare PEG and chitosan hydrogel. In order to prepare these hydrogels, PEG was functionalized with methacrylate groups by reaction with methacrylic anhydride, which could be confirmed by MNR ^1H spectra. Hydrogels were prepared containing PEG-Ch and PEG/Ch-Col on different ratios of collagen, 2 mg mL^{-1} and 6 mg mL^{-1} , which were obtained by crosslinking using potassium persulfate as initiator and *N,N,N',N'*-tetraethylenediamine as activator on two different quantities, 10 mmol and 15 mmol, thus resulting on six different hydrogels systems. Collagen insertion on hydrogels network results in a decrease in the swelling degree, it is also possible to observe collagen on hydrogels network by FTIR-ATR spectra. Biological assays were also done to all hydrogels systems, showing that they presented no toxicity to the cells and could be used as substrate for cell adhesion.

Keywords: Extraction, collagen, PEG, chitosan, hydrogel, biomaterials, biological assay.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são macromoléculas biológicas presentes em todos os seres vivos e exercem uma variedade imensa de funções metabólicas nos organismos¹. Essas moléculas são formadas por subunidades monoméricas conhecidas como aminoácidos, moléculas formadas por um grupo amina, um ácido carboxílico e dois radicais ligados ao carbono assimétrico da molécula, exceto a glicina, que não possui carbono assimétrico. Na formação de uma proteína os aminoácidos se ligam covalentemente entre a amina de um e o ácido carboxílico de outro gerando uma cadeia peptídica característica. Ao longo de toda a cadeia podem acontecer outras interações entre os radicais dos aminoácidos, formando uma estrutura tridimensional e, portanto, aumentando o nível de complexidade da proteína.

Existem vários níveis de complexidade estrutural nas proteínas, onde a simples mudança de aminoácidos em uma região da proteína pode alterar toda sua função biológica. Além disso, a perda da estrutura tridimensional pode fazer com que a proteína perca sua função, processo conhecido como desnaturação, que pode ser causado por uma leve mudança no ambiente do qual a proteína está inserida, como temperatura, pH, determinados solventes e solutos².

Por possuírem sequências de aminoácidos distintas, cada proteína exerce uma função diferente. Um único processo metabólico no corpo geralmente envolve múltiplas proteínas, desde processos simples, como o início da digestão de alimentos com a saliva à composição de todos os tecidos e órgãos no corpo.

Dentro deste grupo de biomoléculas, o colágeno está entre uma das proteínas mais investigadas³⁻⁷. Pertencente ao grupo de proteínas fibrosas, o colágeno é insolúvel e possui alta resistência elástica, sendo responsável pela modulação de forças externas e internas exercidas dentro do organismo^{4,5}. Por se tratar de uma proteína biodegradável e de baixa antigenicidade, é bastante atraente para aplicações na área medicinal³, além de ser amplamente utilizada nas indústrias de couro, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Foram identificados pelo menos 29 tipos de colágeno de origem animal e cada um destes possui uma sequência de aminoácidos e estruturas moleculares próprias³. Dentre todas as formas de colágeno, o tipo I é o mais comum, também encontrado no corpo humano ao longo dos tipos II e III, constituindo

aproximadamente 80% do total de colágeno do corpo. Os colágenos de tipo I e III são essencialmente utilizados na cicatrização de feridas⁶ e o tipo II é o constituinte principal da cartilagem⁷.

Tradicionalmente, o colágeno é isolado da pele de animais terrestres, como porcos, vacas e galinhas. No entanto, a utilização de subprodutos de porcos e vacas apresentam algumas desvantagens, visto que são extrações de custos elevados e com formação de produtos muito viscosos, o que dificulta consideravelmente o isolamento da proteína⁸. Além disso, há o risco de acometimento de doenças infecciosas e/ou contaminantes (gripe aviária, vaca louca, encefalopatia espongiforme bovina, entre outras⁹). Dessa forma, a utilização de subprodutos de peixes como fonte de colágeno tem crescido de forma expressiva por ser considerado uma fonte mais segura, além de apresentar maior percentual de colágeno^{4,10,11}.

Uma vez extraído, o colágeno é muito aplicado como uma matriz base para a regeneração de tecidos fisiológicos. No entanto, isoladamente não apresenta boas propriedades mecânicas e não representa um ambiente ideal para cultivo de células. Para modular e melhorar suas propriedades, o colágeno vem sendo empregado na forma de hidrogel^{3,7,12,13}.

Por apresentarem uma estrutura química similar aos componentes da matriz extracelular e dos tecidos conectivos, os hidrogéis podem ser formulados de forma a possuírem excelente biocompatibilidade. Porém, suas propriedades mecânicas são limitadas, mesmo na forma de hidrogéis. A fim de superar esta delimitação, a utilização de polímeros sintéticos para a preparação de hidrogéis com colágeno pode ser uma alternativa interessante, pois concilia as propriedades mecânicas presentes nos polímeros sintéticos com as propriedades de interação celular do colágeno^{12,13}.

De forma a contribuir aos apontamentos levantados, a presente investigação trata da extração e caracterização do colágeno de pele de tilápia (*Oreochromis Niloticus*). Em seguida, foram elaborados hidrogéis de colágeno/quitosana e polietileno glicol funcionalizado com grupos metacrilato, polímeros utilizados por possuírem boas características celulares importantes para a aplicação dos hidrogéis em medicina regenerativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÍNAS

As proteínas formam um grupo de macromoléculas biológicas extremamente abundante e versátil, responsável por praticamente todos os processos celulares. Sendo assim, são encontradas com abundância em todo reino animal. São polímeros naturais formados por unidades monoméricas chamadas de aminoácidos, estruturas simples que, quando ligados covalentemente, formam cadeias polipeptídicas com funções distintas e expressas de diferentes formas na natureza. A partir das combinações de aminoácidos e das cadeias formadas por estes, diferentes organismos podem gerar enzimas, hormônios, anticorpos, cartilagens, fibras musculares, ossos, penas, veneno, teias, dentre várias outras substâncias biológicas distintas¹.

2.1.1 Aminoácidos

Os aminoácidos são estruturas consideravelmente simples e possuem certas características estruturais comuns, chamados de α -aminoácidos. Possuem um grupo ácido carboxílico e um grupo amina, ambos ligados ao carbono α , e outros dois ligantes: um hidrogênio e uma cadeia carbônica R (exceto a glicina, que possui outro hidrogênio ligante), como mostrado na Figura 1.

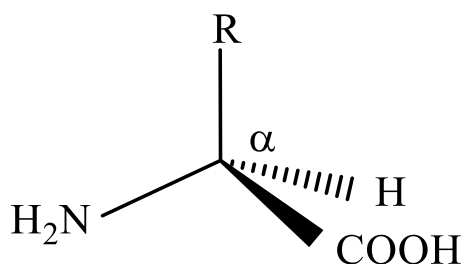


Figura 1: Estrutura química genérica de um aminoácido.

É possível observar que o carbono α possui uma estrutura tetraédrica e é, também, o centro assimétrico da molécula. Portanto, com exceção da glicina que não possui centro de assimetria, os aminoácidos podem ser encontrados nas suas duas formas enantioméricas possíveis, sendo opticamente ativos e classificados a partir destas características. Entretanto, é comum classificar os aminoácidos pelas propriedades dos grupos R ligados ao carbono α

Os aminoácidos podem ser classificados caso os grupos R sejam aromáticos ou alifáticos. Os aminoácidos alanina (Ala), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), prolina (Pro) e valina (Val) possuem em suas estruturas grupos apolares alifáticos e tendem a se agrupar no interior das proteínas, estabilizando-a por suas interações hidrofóbicas. Os aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) possuem grupos aromáticos majoritariamente apolares em sua estrutura, apesar da presença de grupos hidroxila na Tyr, tornando-o um importante componente para enzimas, e nitrogênio no Trp.

Outra característica apresentada pelos grupos R dos aminoácidos está relacionada a carga dos mesmos. Aminoácidos com grupos R não carregados e polares como asparagina (Asn), cisteína (Cys), glutamina (Gln), serina (Ser) e treonina (Thr) são, portanto, solúveis em água. Os aminoácidos Cys, Gln e Asn são casos particulares, visto que a presença do tiol na cisteína pode ser oxidada e formar ligações dissulfeto entre si, formando o aminoácido dimérico cistina. Os aminoácidos Gln e Asn são facilmente hidrolisados por ácidos ou bases e encontradas como amidas dos aminoácidos aspartato (Asp) e glutamato (Glu), os quais possuem cargas negativas e são encontrados majoritariamente em proteínas que formam a parede celular e tecidos conjuntivos. Aminoácidos carregados positivamente arginina (Arg), histidina (His) e lisina (Lys) são polares e superhidrofílicos, agindo principalmente como facilitadores em reações catalisadas por enzimas.

Os aminoácidos apresentados formam um grupo de 20 aminoácidos dos quais estão presentes em todas as proteínas dos seres vivos, de organismos simples como bactérias, aos organismos mais complexos, como os seres humanos. Estes aminoácidos não correspondem à totalidade dos aminoácidos conhecidos. No entanto, os aminoácidos conhecidos como “incomuns” não fazem parte da estrutura das proteínas, mas podem participar como intermediários de rotas biossintéticas na formação de outros aminoácidos ou proteínas bem como em ciclos metabólicos nos organismos^{1,14}.

Para um perfeito funcionamento metabólico do corpo humano, é necessário que haja a presença desses aminoácidos para síntese de todas as proteínas no corpo. No entanto, apenas 12 são sintetizados no organismo, sendo

necessária a ingestão dos demais aminoácidos (essenciais) através da alimentação¹⁵. Duas moléculas de aminoácidos podem se ligar covalentemente através uma reação de condensação entre o grupo α -carboxila de um aminoácido com o grupo α -amina de outro, resultando na formação do grupo amida, mostrado na Figura 2. Quando as ligações ocorrem com um grande número de aminoácidos, formam um polipeptídeo ou as proteínas. Apesar de ambas normalmente serem confundidas, os polipeptídeos são caracterizados por possuírem massa molar abaixo de $10.000 \text{ g mol}^{-1}$, enquanto que as proteínas possuem valores mais elevados de massa molar¹⁵.

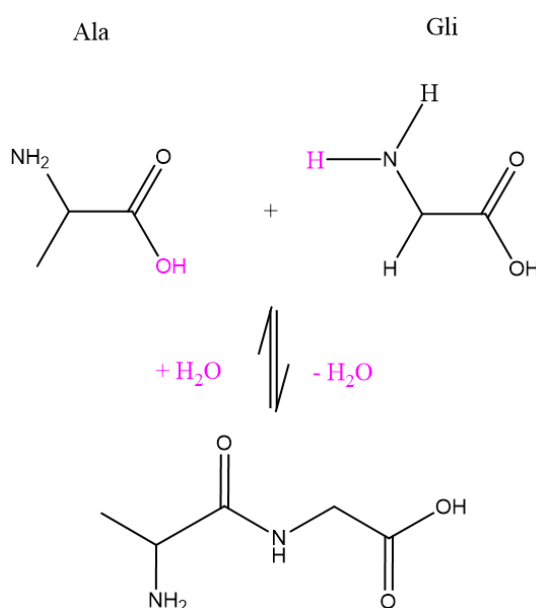


Figura 2: Reação entre os aminoácidos alanina (Ala) e glicina (Gli).

2.1.2 Estrutura Proteica

As proteínas possuem vários níveis de complexidade em sua estrutura. A estrutura mais simples é conhecida como estrutura primária, caracterizada pela sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica; a estrutura secundária é caracterizada pela presença de arranjos de resíduos de aminoácidos que interagem entre si e dão origem a padrões estruturais; a estrutura terciária descreve padrões tridimensionais de um polipeptídeo; a estrutura quaternária é caracterizada pela presença de duas ou mais cadeias polipeptídicas^{1,16}.

A estrutura primária (Figura 3a) de uma proteína é constituída basicamente por uma sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica,

sendo esta estrutura especialmente importante, visto que a simples alteração de aminoácido ao longo da cadeia pode alterar todas as funções da proteína¹⁷. Várias doenças genéticas já foram rastreadas devido à produção de proteínas defeituosas pelo organismo. Sabe-se, por exemplo, que uma simples mudança na sequência de aminoácidos na cadeia da hemoglobina pode gerar anemia falciforme, uma doença genética que afeta os glóbulos vermelhos do sangue^{18,19}.

A estrutura secundária de uma proteína se refere aos arranjos espaciais formados pelas interações entre átomos da cadeia polipeptídica. As estruturas secundárias mais comuns são a α -hélice e conformações β , ambas formadas por ligações de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico de um aminoácido com o hidrogênio da amina de outro²⁰.

A α -hélice (Figura 3b) é uma estrutura formada pela interação dos resíduos de carbonila de um aminoácido com o a amina do quinto aminoácido na cadeia, formando uma estrutura helicoidal estável e projetando os grupos R dos aminoácidos para fora da estrutura, o que possibilita novas interações e contribui para a estabilidade da mesma. Diversos outros fatores podem contribuir para a estabilidade da hélice como as interações entre grupos R das cadeias laterais de um aminoácido e a cadeia lateral de um terceiro resíduo devido à torção da hélice; o volume dos grupos adjacentes; a presença de resíduos de prolina, que possui um anel rígido em sua estrutura, e a glicina, que possui maior flexibilidade conformacional, ambas desestabilizando a hélice; a presença de um dipolo elétrico nas extremidades da cadeia²⁰.

Conformações β mais comuns são a em forma de “folha” e “voltas”. Na primeira ocorre o alinhamento de dois segmentos de uma cadeia polipeptídica que interagem por ligação de hidrogênio e formam uma estrutura tipo “folha”. A conformação de “voltas β ” ocorrem com a interação entre as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma folha β . Resíduos de prolina e glicina são comumente encontrados em conformações β , especialmente em voltas, visto que a glicina é um aminoácido pequeno e flexível, e a prolina possui conformação de resíduos entropicamente favorável para formação de voltas^{20,21}.

O arranjo tridimensional total da cadeia polipeptídica forma a estrutura terciária (Figura 3c), conformação da qual é majoritariamente encontrada nas

proteínas. A formação dessa estrutura se deve principalmente por interações interatômicas fracas, como forças de London, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos¹.

Uma ligação em particular que melhor contribui para manter a estrutura terciária da proteína é a ligação dissulfeto, uma ligação de origem covalente entre grupos tiol presente na estrutura da cisteína. Portanto, é uma ligação mais forte que as simples interações interatômicas na estrutura. Quando duas ou mais cadeias polipeptídicas interagem através das interações interatômicas fracas, forma-se a estrutura quaternária (Figura 3d) ¹.

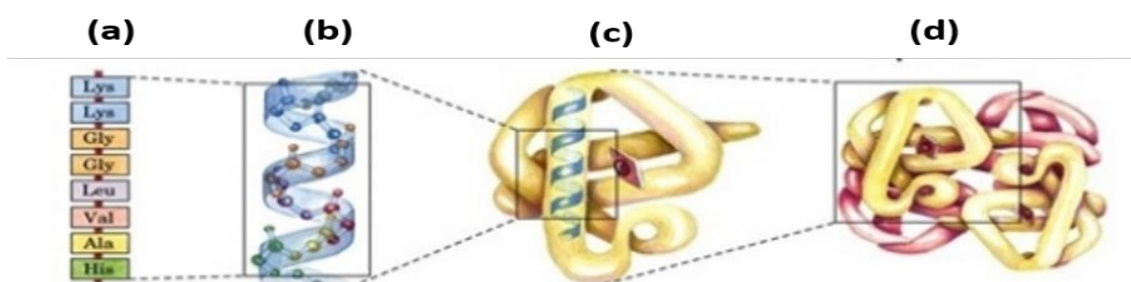


Figura 3: Conformações proteicas **(a)** estrutura primária, **(b)** estrutura secundária **(c)** estrutura terciária e **(d)** estrutura quaternária. Imagem tirada e adaptada da referência [1].

Sob determinadas condições, as proteínas podem perder a sua estrutura tridimensional com o rompimento das interações interatômicas presentes na mesma, podendo ocasionar a perda de suas funções biológicas. Porém, sua estrutura primária é mantida, visto que não há rompimento das ligações covalentes entre os aminoácidos. Esse processo é chamado de desnaturação e pode ser causado por uma simples mudança no ambiente em que a proteína está inserida, como o aumento da temperatura, pressão, agitação mecânica, mudança de pH e determinados solventes^{2,15}.

Apesar de ser permanente para muitas proteínas, a desnaturação pode ser reversível em outras, processo conhecido como renaturação. Estudos mostram que algumas proteínas possuem a capacidade de se “re-enovelar” em sua estrutura terciária ou quaternária naturalmente ou assistida por proteínas chaperonas, proteínas que interagem com cadeias de polipeptídeos parcialmente enovelados ou enovelados incorretamente, facilitando o processo de renaturação da proteína^{2,22}.

2.1.3 Proteínas Globulares e Fibrosas

As proteínas, portanto, são o resultado das interações entre os aminoácidos das cadeias peptídicas, formando conformações diferentes das quais são classificadas como proteínas solúveis (globulares) e proteínas fibrosas. As proteínas globulares são formadas por α -hélices, “folhas” e “voltas” que se enovelam em uma esfera ou ovóides, de forma em que sua estrutura terciária consiste no arranjo de aminoácidos hidrofílicos para fora e aminoácidos hidrofóbicos para dentro da estrutura. Portanto são proteínas solúveis em água e que possuem estabilidade conformacional muito baixa visto que há um custo entrópico no enovelamento e são facilmente desnaturadas fora de condições fisiológicas^{23,24}.

As funções proteicas normalmente envolvem sua interação com outras moléculas. Exemplos dessa interação são as proteínas de transporte da família globina, que possuem estruturas primárias e terciárias semelhantes e que exercem a função de transporte e difusão do oxigênio, óxido nítrico, dióxido de carbono e monóxido de carbono dos seres vivos, os últimos sendo tóxicos¹. Possuem também uma importante ação hormonal, agindo como mensageiras que ajudam a coordenar funções metabólicas. Exemplos dessas proteínas são a insulina, que ajuda a regular a concentração de glicose no sangue, e a oxitocina, hormônio ligado ao prazer e bem-estar, fortemente relacionado às interações humanas, bem como estimula contrações uterinas durante o parto em mamíferos^{25,26}. Outra classe importante de proteínas globulares são as enzimas, catalisadores naturais responsáveis em auxiliar reações bioquímicas, como a lactase e pepsina, responsáveis pelo metabolismo de lactose e proteínas, respectivamente^{27,28}.

Proteínas fibrosas ou fibrilares, conhecidas também como escleroproteínas, são o grupo de proteínas responsáveis pela formação dos tecidos conjuntivos nos animais. São proteínas diretamente relacionadas à manutenção celular, sustentação e arquitetura do corpo, logo, possuem funções intra e extracelulares. Suas funções intracelulares são relacionadas à actina e tubulina, duas proteínas globulares de tamanho similares formadas por α hélices e conformações β , que se agregam em estruturas fibrilares, responsáveis pela

ligação entre nucleotídeos e participam de diversos mecanismos celulares (tabela 1)^{29,30}.

Diferentemente das proteínas fibrosas intracelulares, as extracelulares possuem papéis variados, que vão da estabilidade dos tecidos aos receptores de sinalização molecular. O colágeno é o principal responsável pela formação dos tecidos conjuntivos, encontrado nos ossos, dentes, pele, artérias, cartilagem, músculos, dentre outros. A elastina, como sugerido pelo nome, fornece elasticidade a determinados tecidos. Outras funções e proteínas são mostradas na tabela 1 ^{29,30}.

Tabela 1: Proteínas fibrosas intracelulares e extracelulares e suas funções.

Tipo	Proteína	Funções
Intracelular	Actina	Fagocitose, formato e movimentação celular, contração de anel durante divisão celular, contração muscular.
	Tubulina	Transporte e divisão celular.
	Intermediários	Resistência a estresse mecânico celular, neurofilamentos, camadas de proteção à estímulos externos (cabelos, unhas e pele).
Extracelular	Colágeno	Formação de tecido conjuntivo.
	Elastina	Elasticidade aos tecidos.
	Fibrilina	Proteínas auxiliar à elastina, promove elasticidade aos tecidos.
	Laminina	Desenvolvimento embrionários, diferenciação celular, migração, adesão e crescimento celular, formação de membranas basais.
	Fibronectina	Adesão celular, cicatrização de feridas, orientação e migração celular durante embriogênese.
	Fibrina	Coagulação sanguínea.

As proteínas colagenosas se destacam entre as proteínas fibrosas por formarem o grupo de proteínas mais abundante nos mamíferos. Essas proteínas possuem utilidades incrivelmente amplas e serão abordadas como objeto de

estudo deste trabalho, desde a sua composição, tipos de colágeno, extração, purificação e, por fim, suas aplicações.

2.1.4 Colágeno

O termo “colágeno” é um termo genérico usado para proteínas formadas por uma hélice tripla característica com três cadeias polipeptídicas, sendo os diferentes tipos de colágenos caracterizados pela sua estrutura complexa e diversificada. A família de colágenos mais abundante é representada por formadores de fibrilas, que são 90% dos tipos de colágenos conhecidos. Dentre estes, estão presentes os colágenos tipo I, II e III, caracterizados pelas suas habilidades de se agrupar em agregados supramoleculares de alta orientação e superestrutura característica, típica de arranjo de fibras, bem como suas diferentes funções nos organismos^{4,7}.

São conhecidos hoje 29 tipos de colágeno, formando o grupo de proteínas mais abundante no reino animal, cada qual com características e funções próprias. São fundamentais na formação da matriz extracelular do tecido conjuntivo propriamente dito e tecidos conjuntivos com propriedades especiais, que garantem aos corpos estruturação, organização, sustentação e excelentes propriedades biomecânicas, mostrando grande versatilidade⁷.

O colágeno(I) é o colágeno mais abundante e mais estudado atualmente, sendo este presente em cerca de 90% da massa orgânica dos ossos, além de ser o principal colágeno da formação da pele. Sua hélice tripla é normalmente formada como um heterotrímero de duas cadeias $\alpha 1(I)$ idênticas e uma $\alpha 2(I)$. As fibras da hélice tripla deste colágeno também são majoritariamente incorporadas em componentes contendo outros tipos de colágeno, como pele e fibras reticulares, ossos, tendões e córneas^{31,32}. O colágeno(I) aumenta a rigidez à tração na maioria dos órgãos, principalmente em tendões e fâscias, além de definir propriedades biomecânicas importantes como capacidade de carga, força de tensão e rigidez torcional⁷.

Apesar da imensa quantidade de colágenos encontrados nos animais, todos eles possuem uma característica em comum: a presença de uma hélice tripla composta por três cadeias α com a presença de um resíduo de glicina a cada três posições da cadeia polipeptídica, resultando em domínios $(Gly-X-Y)_n$

chamado de “colagenoso”. Para os colágenos formadores de fibrilas citados, esses domínios são bastante predominantes, podendo conter até 1000 aminoácidos, do contrário outros tipos de colágeno, como VI e X possuem até 460 aminoácidos em seus domínios colagenosos⁷.

Apesar da hélice tripla ser uma característica importante na proteína, os domínios não-colagenosos também apresentam relevância estrutural, mostrados na Figura 4. Como exemplo o C-propeptídeo e N-propeptídeo, responsáveis pela iniciação da formação da hélice tripla e regulamentação do diâmetro das fibrilas, respectivamente, e também os telopeptídeos, que são as terminações não-helicoidais e estão envolvidos na reticulação de moléculas de colágeno e em ligações com outras moléculas do entorno^{7,33}.

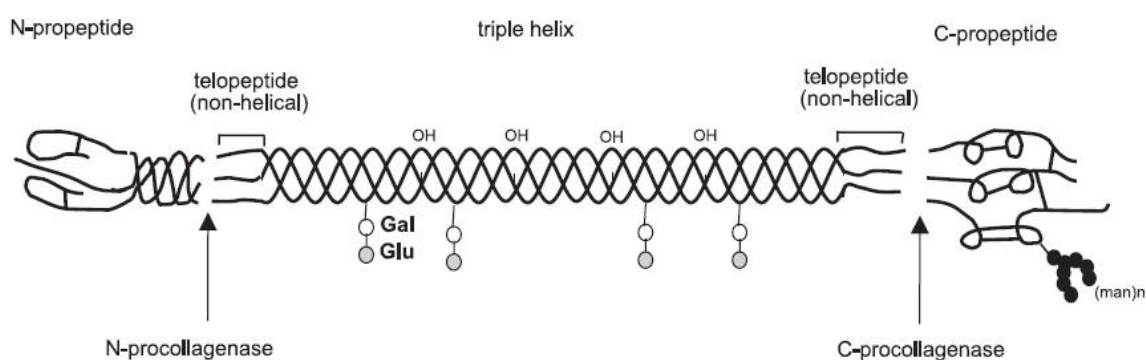


Figura 4: Estrutura fibrilar do colágeno e seus subdomínios. Imagem retirada da referência [7].

Como um polímero natural muito abundante e que exerce funções muito variadas, o estudo do colágeno se mostra muito atraente em diversas áreas de interesse. No entanto, por sua natureza reticulada, é necessário que a proteína seja extraída anteriormente. Portanto, foram desenvolvidos alguns métodos de extração do colágeno dos quais serão explanados a seguir.

2.1.5 Extração de Colágeno

A extração do colágeno de subprodutos animais pode ser feita de três maneiras distintas, classificadas pelo produto obtido: solução em sal neutro colagenosa (*Neutral Salt-Solubilized Collagen – NSSC*), solução ácida colagenosa (*Acid-Solubilized Collagen – ASC*) e solução de pepsina colagenosa (*Pepsin-Solubilized Collagen – PSC*)³⁴. Os processos de extração são semelhantes entre si, consistindo em um pré-tratamento do subproduto para

remover os sais e outras proteínas não-colagenosas superficiais do mesmo, e a extração com a solução em questão. No entanto, a quantidade de colágeno extraído difere para cada método, bem como o tipo do colágeno a ser extraído. Estudos mostram que os colágenos possuem boa solubilidade em meio ácido e soluções ácidas contendo pepsina, sendo assim são os dois processos mais utilizados para extração do mesmo^{11,34,35}.

A hidrólise química do colágeno pode ser realizada em solução salina neutra, solução ácida ou enzimática, como afirmado anteriormente. A extração realizada em solução salina possui limitações devido à natureza reticulada do colágeno, por isso é pouco utilizada para extração da proteína. Wang e Xu *et al.*³⁶ demonstraram que o NSSC extraído de esturjão (*Acipenser Schrenckii*) possuía menor quantidade de colágeno quando comparado ao ASC e PSC. Portanto, os métodos mais utilizados são hidrólise ácida e enzimática.

A hidrólise ácida pode ser realizada tanto utilizando ácidos orgânicos ou inorgânicos. No entanto, os ácidos orgânicos são capazes de solubilizar o colágeno não-reticulado, levando à uma maior solubilidade da proteína, portanto, soluções de ácidos orgânicos são mais frequentemente utilizados, em especial o ácido acético³⁷.

A hidrólise enzimática é realizada, também, em solução de ácido acético adicionando pepsina à solução, esta sendo uma enzima produzida no estômago e ativada pela acidez do ambiente (pH ~ 2). Portanto é fundamental que a solução de extração do colágeno também seja ácida, facilitando a “digestão” da proteína³⁸.

Sun *et al.*³⁹ demonstraram que o colágeno extraído tanto por hidrólise química quanto enzimática da pele de tilápia não demonstram notáveis diferenças em suas características físico-químicas, com temperaturas de desnaturação semelhantes. Porém, a viscosidade da ASC era superior ao PSC devido a maior solubilidade da proteína em hidrólise enzimática, o que também é relacionado a maior quantidade de colágeno extraído. No entanto, a utilização da pepsina torna o processo mais sensível à temperatura e ainda mais caro.

Subprodutos originários de animais terrestres, por exemplo, aves, porcos e vacas, são tradicionalmente utilizados para extração. Subprodutos bovinos são

atualmente as principais fontes do colágeno industrial, utilizando principalmente o tendão de Aquiles, placenta, cartilagem nasal e articular para extrair colágeno(I), (IV) e (II), respectivamente. Subprodutos suínos também são muito utilizados na extração de colágeno pela sua semelhança com colágeno humano, utilizando pele e ossos como principais fontes para extração. Essa semelhança com o colágeno humano diminui a chance de respostas alérgicas quando o mesmo é consumido⁸.

Uma busca realizada na *Web of Science*, na base de dados *Derwent Innovations Index* mostra o número de patentes com o tópico de “extração de colágeno” depositadas ao longo de 51 anos (Figura 5). Nota-se um crescente interesse em se desenvolver e otimizar métodos de extração do material, devido a crescente utilização do mesmo e várias áreas de atuação. Apenas nos últimos 5 anos há um depósito de 1226 patentes, totalizando 2488 depósitos ao longo desses 51 anos, ressaltando que o tópico de extração de colágeno realizado durante a busca inclui a extração de ambos subprodutos de animais terrestres e aquáticos.

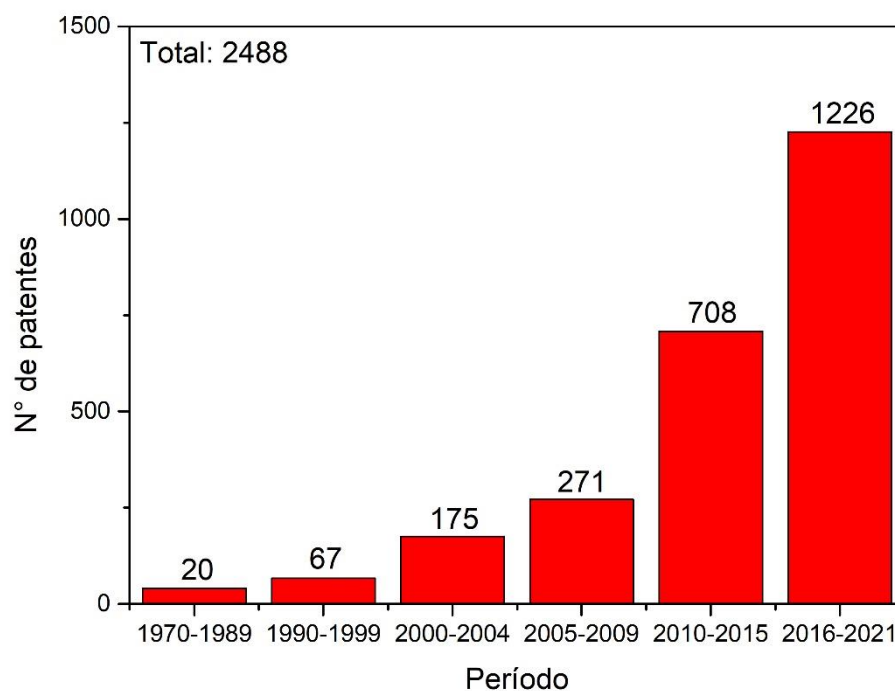


Figura 5: Número de patentes depositadas sobre extração de colágeno. Fonte *Derwent Innovations Index*, pesquisa realizada em fevereiro de 2021.

Apesar de serem as principais fontes de colágeno industrial, a utilização de subprodutos de animais terrestres pode apresentar efeitos negativos. Estima-se que aproximadamente 3% da população possui reações alérgicas ao colágeno de fonte bovina, o que é minimizado com colágeno de origem suína⁸. Mesmo minimizando reações alérgicas, essas fontes apresentam riscos de doenças infecciosas e contaminantes como encefalopatias espongiformes transmissíveis (doença da vaca louca e doença de Creutzfeldt-Jakob), febre aftosa, zoonoses e gripe aviária. Além disso, também existem barreiras religiosas, visto que o judaísmo e o islamismo proíbem o consumo e utilização de produtos suínos e derivados e o hinduísmo em relação aos produtos de fonte bovina^{4,8-11}.

Tendo em vista os problemas relacionados a utilização de subprodutos de animais terrestres para a extração do colágeno, tem-se utilizado vastamente subprodutos de animais aquáticos, como peixe, estrela-do-mar, ouriço do mar, lula e polvo como opções viáveis⁸. Novos estudos mostram que a utilização de tais fontes previne respostas adversas que podem causar complicações à saúde humana ao se utilizar dos produtos provenientes de animais terrestres, citadas

anteriormente. Ainda, subprodutos de animais aquáticos possuem maior percentual de colágeno, contendo até 12 g de colágeno em 1 kg de material usado, tornando o processo mais eficiente^{4,11,40}.

Apesar da utilização de animais aquáticos para extração de colágeno se apresentar como uma opção mais viável, o processo de extração deve ser metuculoso, visto que a temperatura de desnaturação do colágeno proveniente de animais marinhos é normalmente baixa devido a menor quantidade de aminoácidos prolina e hidroxiprolina. A desnaturação do colágeno está normalmente relacionada com a temperatura corporal. Portanto, animais terrestres, especialmente mamíferos, que possuem maior temperatura corporal possuem colágeno mais resistente à desnaturação e, por consequência, possuem maior aplicação industrial^{34,41,42}.

Atualmente, no mercado industrial a líder mundial de distribuição de peptídeos de colágeno é a GELITA™, empresa fundada em 1875 em Eberbach, Alemanha. A empresa utiliza principalmente o colágeno de subprodutos suínos e bovinos no desenvolvimento de seus produtos (Figura 6), os quais possuem uma grande variedade de aplicações, como suplementos alimentares, cosméticos de cuidados com a pele, articulações, tendões, ossos e tônus muscular⁴³.

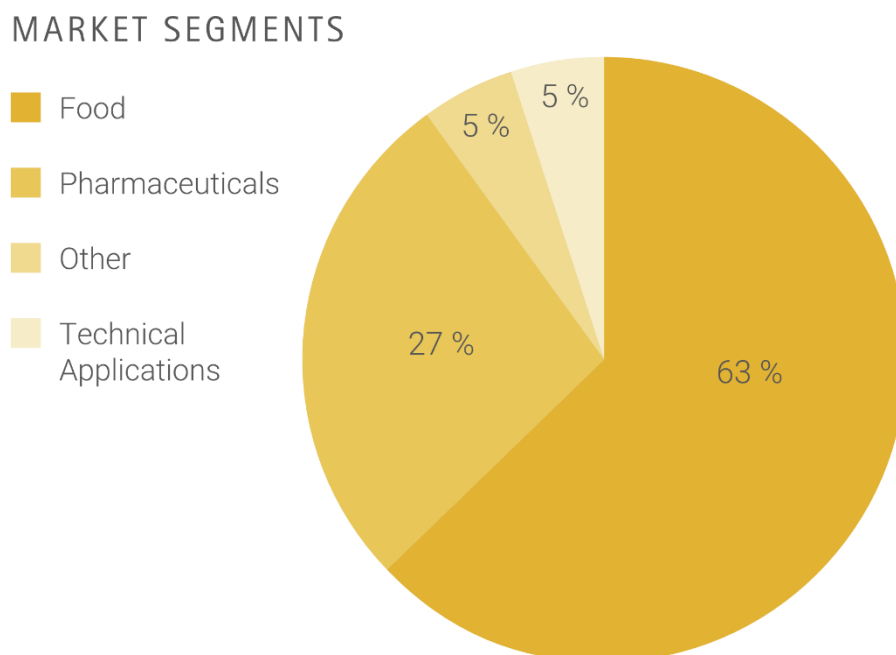


Figura 6: Infográfico dos produtos de peptídeos de colágeno da empresa GELITA™. Imagem tirada da fonte [43].

No mercado brasileiro há um predomínio dos produtos da empresa GELNEX™, empresa fundada em 1998 em Itá-SC. Hoje, possui unidades em São Paulo, Goiás, Tocantins e Mato Grosso, sendo a líder brasileira em vendas de gelatina e peptídeos de colágeno de fonte suína e bovina (PEPTINEX®), com principal utilização em suplementos e aditivos alimentares e em cosméticos. O colágeno utilizado pela empresa é extraído por hidrólise térmica e química, seguido de um processo de hidrólise enzimática, normalmente pepsina, resultando na obtenção dos peptídeos de colágeno. Por sua vez a gelatina é produzida por um processo de hidrólise parcial do colágeno nativo⁴⁴.

Industrialmente o colágeno proveniente de subprodutos de animais terrestres apresenta vantagens em relação ao colágeno de subprodutos de animais aquáticos. No entanto, novos estudos mostram que o colágeno extraído de subprodutos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em solução ácida ou enzimática apresenta uma temperatura de desnaturação acima do que é normalmente observado em animais aquáticos, em torno de 32 °C à 35 °C, temperatura ideal para utilização humana^{8,34,42,45}.

Na tabela 2 é mostrado um comparativo entre o colágeno extraído de subprodutos de mamíferos e animais marinhos

Tabela 2: Comparativo entre os processos de extração de subprodutos de animais marinhos e mamíferos.

Mamíferos	Animais marinhos
Alta temperatura de desnaturação.	Baixa temperatura de desnaturação.
Procedimento mais caro.	Procedimento mais barato.
Soluções de alta viscosidade.	Soluções de baixa viscosidade.
Difícil extração.	Extração facilitada.
Solúvel em solvente orgânico.	Solúvel em água.
Risco de doenças transmissíveis e infecciosas.	Não há riscos de doenças transmissíveis e infecciosas.
Baixa quantidade de colágeno.	Alta quantidade de colágeno.

2.1.6 Purificação de Proteínas

São conhecidas diversas formas de se purificar uma proteína, no entanto a purificação por precipitação se mostra, ainda hoje, o processo mais relevante e, portanto, mais utilizado para purificação. O processo consiste em separar as proteínas a partir de sua solubilidade, visto que ao longo da cadeia peptídica há resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Cada proteína possui uma ou mais cadeias de aminoácidos distintos, suas devidas solubilidades também são distintas⁴⁶.

A seguir, os principais métodos de purificação de proteínas serão brevemente discutidos.

2.1.6.1 Precipitação em Solventes Orgânicos

A precipitação em solventes orgânicos consiste em adicionar um solvente orgânico miscível, normalmente etanol e acetona, ao extrato proteico, assim reduzindo o poder de solvatação da água com a proteína. Portanto, há uma redução na constante dielétrica do solvente e imobilização parcial das moléculas de água devido à hidratação do solvente orgânico.

Esse processo normalmente utiliza uma baixa concentração de solvente orgânico, próximo ao ponto isoelétrico da proteína, o que sugere que as interações proteína-proteína sejam semelhantes à precipitação isoelétrica

(solubilidade em baixas concentrações salinas). Outro fator considerável é o tamanho da proteína, visto que moléculas maiores tendem a se agregar mais facilmente por possuírem regiões eletronicamente carregadas que correspondem melhor à outras proteínas.

Ao se utilizar desse processo, deve-se levar em consideração a escolha do solvente, visto que muitos solventes orgânicos podem ser tóxicos, inflamáveis e podem gerar gases nocivos, dificultando sua utilização em escala laboratorial. A maior vantagem desse processo se deve pela possibilidade de purificação da proteína à baixas temperaturas, inclusive abaixo de 0 °C evitando, dessa forma, a desnaturação da proteína pelo calor.

2.1.6.2 Precipitação com Polímeros Orgânicos

A precipitação utilizando polímeros orgânicos se mostra uma opção à utilização de solventes orgânicos sem ocorrer a desnaturação da proteína. No entanto, estudos mostram que esse processo normalmente envolve um grande aumento na viscosidade das soluções proteicas, mostrando-se impraticável e, portanto, pouco utilizado.

A opção viável de polímero para o processo, sem que haja um aumento drástico na viscosidade da solução, é a utilização de polietileno glicol (PEG). Para isso, massas molares entre 6.000 e 20.000 g mol⁻¹ são as mais comuns para este polímero, pois respondem melhor às proteínas de baixa solubilidade. No entanto, o PEG apresenta dificuldade maior em ser removido da fração proteica em relação aos solventes e sais, visto que os últimos podem ser removidos rapidamente por diálise.

2.1.6.3 Precipitação por Afinidade

A precipitação por afinidade consiste em fazer uso de interações específicas e seletivas das proteínas com determinado ligante. A natureza do ligante é, também, proteica, onde normalmente são utilizados ácidos nucleicos e anticorpos. Portanto, há um reconhecimento dos sítios das proteínas, formando agregados moleculares que irão precipitar no meio.

2.1.6.4 Solubilidade em Baixas Concentrações Salinas

Esse processo é normalmente feito utilizando-se água como solvente, geralmente utilizado na precipitação de proteínas globulares, que possuem boa

solubilidade em condições salinas fisiológicas. Nestas condições, as interações eletrostáticas das proteínas e sais na solução estão em equilíbrio, chamado de ponto isoelétrico. Uma leve mudança na concentração próxima ao ponto isoelétrico incita uma maior interação proteína-proteína, fazendo com que esta precipite.

O procedimento é conhecido também como precipitação isoelétrica e é particularmente difícil de se reproduzir em uma mistura de proteínas, visto que outras proteínas podem se agregar à proteína de interesse pura com a mudança da concentração salina.

2.1.6.5 *Salting-out à Altas Concentrações Salinas*

Salting-out é a técnica mais utilizada na purificação de proteínas, especialmente enzimas, utilizando-se de solvente aquoso e altas concentrações salinas. O processo consiste em adicionar um determinado sal a uma solução proteica. À medida que a concentração de sais aumenta, as moléculas de sais serão solvatadas, logo há uma tendência maior das cadeias de proteínas interagirem entre si e precipitarem.

É importante também entender a natureza do sal utilizado no processo de *salting-out*, visto que sais que interagem com as proteínas podem inibir a precipitação das mesmas bem como deve-se considerar sua solubilidade no meio. Sendo assim, dá-se preferência aos sais que estimulam a hidratação das regiões polares da proteína sem interagir diretamente com a mesma. Para essa finalidade, utiliza-se com maior frequência sais com ânions multivalentes (sulfato e fosfato) e cátions inertes em relação à proteína, como sódio, amônio e potássio.

Outros fatores devem ser levados em consideração visto que é um processo dependente da solubilidade das proteínas na mistura e, portanto, alterações na solubilidade podem alterar o resultado final. Os fatores mais comuns que alteram a solubilidade são o pH da mistura e a temperatura.

A solubilidade de sais é normalmente maior em pH neutro, no qual as proteínas normalmente possuem o maior número de grupos carregados. No entanto, as proteínas se agregam mais facilmente próximo ao ponto isoelétrico, que é distinto para cada proteína. A solubilidade das proteínas normalmente

diminui com o aumento da temperatura, inibindo a separação das misturas de proteínas e, portanto, dificultando a purificação.

2.1.6.6 Eletroforese

Devido à grande variedade de proteínas e das dificuldades em realizar o processo de purificação destas, torna-se importante identificá-las ao serem utilizadas em meio industrial e laboratorial. Apesar de não ser utilizada para purificação de proteínas, a caracterização por eletroforese permite a visualização e separação de proteínas ou estimar o seu grau de pureza. A técnica se baseia na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, logo, o método analítico é realizado em géis de poliacrilamida, que retardam a migração das proteínas em proporção à razão carga-massa¹.

A força motriz do procedimento se baseia no potencial elétrico da molécula, um parâmetro que relaciona a velocidade de migração pelo campo elétrico aplicado, resultando na mobilidade eletroforética μ descrita pela equação 1. A partir da equação é possível observar que a mobilidade eletroforética é, portanto, uma função do tamanho e formato da proteína analisada^{1,47}.

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f} \quad (1)$$

μ = Mobilidade eletroforética

V = Velocidade

E = Potencial elétrico

Z = Carga

f = Coeficiente de fricção

Um método de eletroforese muito aplicado é utilizando o dodecil sulfato de sódio ($\text{NaCH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4$). Sua utilização se deve pela capacidade de se ligar com aminoácidos contribuindo para uma carga final negativa, conferindo a cada proteína uma razão carga-massa semelhante, bem como o desdobramento de algumas proteínas quando ligadas. Esses dois fatores permitem que as proteínas sejam separadas com base em sua massa molecular^{1,47}.

O procedimento de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), mostrado na Figura 7, consiste na adição das amostras em poços no topo do gel de poliacrilamida seguido da aplicação de um campo elétrico, permitindo com que as proteínas migrem ao longo do gel. Visto que o SDS permite que as proteínas sejam separadas quase que exclusivamente pela massa molar, pode-se afirmar que proteínas com menores massas irão migrar mais rapidamente que proteínas com massas maiores, portanto há uma separação das cadeias ao longo do gel. Essa separação das proteínas pode ser vista ao se adicionar um corante, como o corante de base FAST BLUE®, produzido e comercializado nacionalmente pela SCIENCO BIOTECH™^{47,48}.

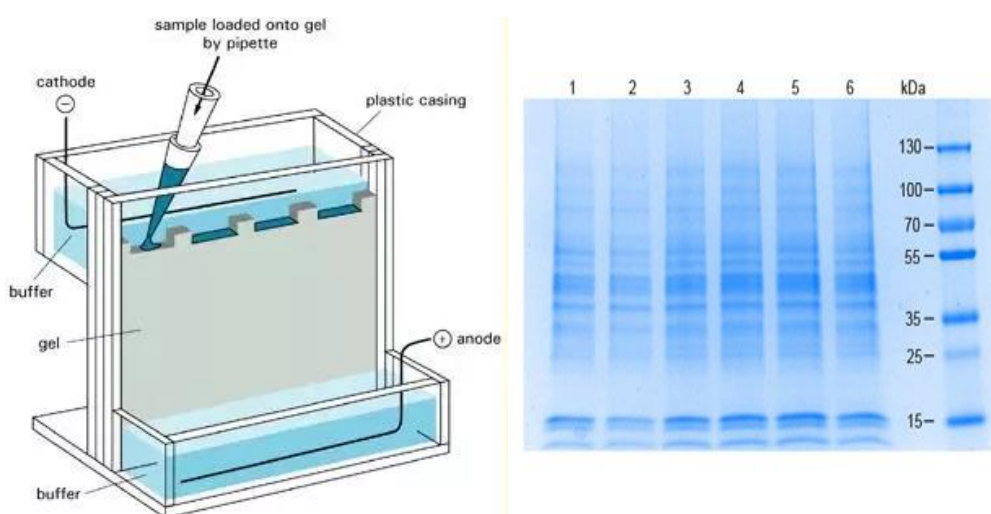


Figura 7: Célula de eletroforese à esquerda e, à direita, resultado da separação das proteínas após à adição do corante ao gel. Imagem retirada da referência [1].

Outros processos de purificação são conhecidos e estudados na literatura, como purificação por adsorção, que envolve métodos como troca iônica, afinidade, adsorventes específicos, e purificação por proteínas recombinantes. Entretanto, devido à disponibilidade e fácil manuseio, o presente trabalho utiliza o método de *salting-out* com o intuito de purificar colágeno, em especial colágeno(I), extraído da pele do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*), utilizando os sais sulfato de amônio $[(NH_4)_2SO_4]$ e cloreto de sódio (NaCl).

2.1.7 Aplicações do Colágeno

Devido às características biológicas excelentes, o colágeno possui aplicações muito diversas, desde a indústria farmacêutica, cosmética, biomédica, alimentícia, engenharia de tecidos, couros e filmes, medicina regenerativa, entre outros várias outras^{3,6,7,13,49-52}.

O colágeno utilizado na indústria farmacêutica e biomédica serve como sistemas de liberação de drogas, dispersões injetáveis, matrizes para regeneração de tecidos e micropartículas, bem como utilizado na formulação de cosméticos, em especial, dermatológicos como máscaras para pele, cremes hidratantes e protetores solares^{7,49,52-57}. Outros estudos mostram que o colágeno hidrolisado e utilizado como suplementação alimentícia possui ótimos resultados quanto à redução de rugas e aumento da rigidez da pele^{52,58}.

Para a indústria de couros, a pele do animal passa por um processo de curtimento, que consiste em reticular o colágeno, deixando-o mais forte, durável e prevenindo que se deteriore⁵². Outras características do produto vão variar de acordo com o processo de curtimento, como a utilização de diferentes aditivos e a orientação das fibras do colágeno. Uma boa parcela das pesquisas atualmente são focadas em como deixar o processo de curtimento ambientalmente correto, diminuindo a quantidade de resíduos tóxicos^{52,59-62}.

É possível encontra-lo, também, em todas as áreas de atuação do campo médico e medicina regenerativa^{3,13}. A Figura 8 mostra um gráfico correlacionando a aplicação do colágeno em diferentes áreas de pesquisas, com mais de 200.000 artigos publicados ao longo dos anos, de acordo com a base de dados *Web of Science*.

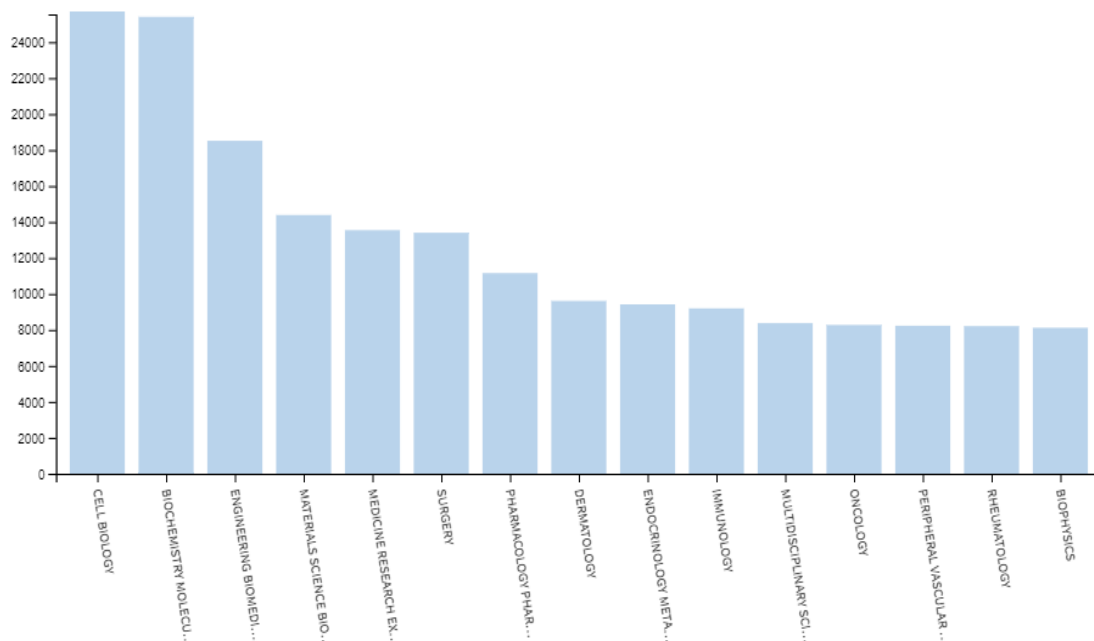


Figura 8: Número de artigos publicados com assunto "colágeno" e suas respectivas áreas de interesse. Pesquisa realizada em abril de 2021.

Utiliza-se especialmente do colágeno(I); na área cardiovascular ele pode ser utilizado como matriz pra regeneração dos tecidos cardíacos^{63,64}, válvulas cardíacas e circulatórias^{64,65}; na área dermatológica pode ser utilizado como substituto da pele e constituinte de peles artificiais^{66,67} e ajudar no processo de cicatrização^{68,69}; na área ortopédica é utilizado no reparo de tendões, ossos e ligamentos^{70–72} e na reconstrução de cartilagem⁷¹; na oftalmologia é utilizado em enxertos corneais e lentes de contato^{73–76}. Essas e outras aplicações são ilustradas na tabela 3.

Tabela 3: Funções do colágeno em áreas diversas.

Área	Função	Referência
Cardiovascular	- Regeneração de tecido - Válvulas cardíacas	Ragaert <i>et al.</i> ⁶³ Huang <i>et al.</i> ⁶⁴ Tedder <i>et al.</i> ⁶⁵ Fu <i>et al.</i> ⁷⁷
Ortopedia	- Reparo de tendões, ligamentos e ossos - Facilitador de implantes - Ligação e proliferação de células estromais.	Rose e Oreffo <i>et al.</i> ⁷⁰ Cunniffe e O'Brian <i>et al.</i> ⁷¹ Sanz-Herrera <i>et al.</i> ⁷² Ao <i>et al.</i> ⁷⁸ El-Jawhari <i>et al.</i> ⁷⁹

Oftalmologia	<ul style="list-style-type: none"> - Exerto corneal - Lente de contato - Tratamento de ceratocone. - Tratamento de glaucoma. 	<p>Fagerholm <i>et al.</i>⁷⁴ Duan <i>et al.</i>⁷³. Khan e Khan <i>et al.</i>⁷⁶ Matthyssen <i>et al.</i>⁷⁵ Ng <i>et al.</i>⁸⁰ Sng <i>et al.</i>⁸¹</p>
Dermatologia	<ul style="list-style-type: none"> - Substituto de pele. - Pele artificial. - Cicatrização de feridas. - Efeito antiinflamatório em dermatite atrópica. - Regulador de melanomas. 	<p>Ojeh <i>et al.</i>⁶⁶ MacNeil <i>et al.</i>⁶⁷ Ahn <i>et al.</i>⁶⁸ Kallis e Friedman <i>et al.</i>⁸² Atkinson <i>et al.</i>⁸³ Mistry <i>et al.</i>⁸⁴ Hakuta <i>et al.</i>⁸⁵</p>
Odontologia	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento de periodontite. - Implantes. - Adesivos em ligação dentária. 	<p>Sheikh <i>et al.</i>⁸⁶ Hass <i>et al.</i>⁸⁷ Breschi <i>et al.</i>⁸⁸</p>
Neurologia	<ul style="list-style-type: none"> - Regeneração de nervo ciático - Funcionamento da junção neuromuscular 	<p>Li <i>et al.</i>⁸⁹ Cescon <i>et al.</i>⁹⁰</p>

O colágeno, portanto, é um importante componente utilizado na preparação de matrizes que visam a regeneração de diversos tecidos. No entanto, como o material bruto apresenta limitações, em especial por possuir características mecânicas pobres e não corresponder à necessidade de um *scaffold* tridimensional para cultivo de células. Uma maneira de contornar essa limitação é utilizando-o como material no desenvolvimento de hidrogéis, de tal forma que suas propriedades mecânicas possam ser ajustadas à necessidade de uso e criando um ambiente ideal no cultivo de células^{13,49,91,92}.

2.2 HIDROGÉIS

Hidrogéis são materiais compostos por redes poliméricas reticuladas tridimensionalmente e são caracterizados pela capacidade de absorver e reter

uma enorme quantidade de líquidos aquosos, podendo ultrapassar até 1000% do seu peso seco. Ainda, podem apresentar uma estrutura porosa que lhes confere características físico-químicas semelhantes a uma matriz extracelular (MEC)⁹³.

O estudo de hidrogéis iniciou em meados de 1960 por Wichterle e Lím ao descreverem o material feito de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA) e apresentaram resultados promissores ao utilizar o material como preenchimento após enucleação ocular, produção de lentes de contato, artérias, entre outros. Desde a descrição do material, as pesquisas que envolvem a utilização de hidrogéis aumentaram e tornaram suas aplicações muito diversas^{93,94}.

Um hidrogel pode ser classificado como físico ou químico de acordo com o tipo de reticulação, sua composição polimérica (homopolímero, copolímero, rede polimérica semi-interpenetrante e rede polimérica interpenetrante), sua matéria-prima que pode ser natural, sintética ou híbrida, e apresentar uma resposta a determinados estímulos.

2.2.1 Tipos de reticulação

A formação da rede reticulada de um hidrogel pode acontecer por interações físicas ou ligações químicas, mostrados na Figura 9. Os hidrogéis de reticulação física são formados por interações intermoleculares, muitas vezes ligações de hidrogênio, que formam zonas de junção ao longo das cadeias poliméricas. Visto que um hidrogel de reticulação física é formado por interações fracas, estas podem ser rompidas com maior facilidade e, portanto, trata-se de uma reticulação reversível^{93,95}.

Os hidrogéis de reticulação química são formados por ligações de natureza covalente entre as cadeias poliméricas, sendo materiais que possuem excelente estabilidade mecânica. As formas das quais a reticulação química pode ser feita envolvem ação enzimática, irradiação e polimerização radicalar. Logo, se faz necessária a utilização de agentes reticulantes^{93,96}.

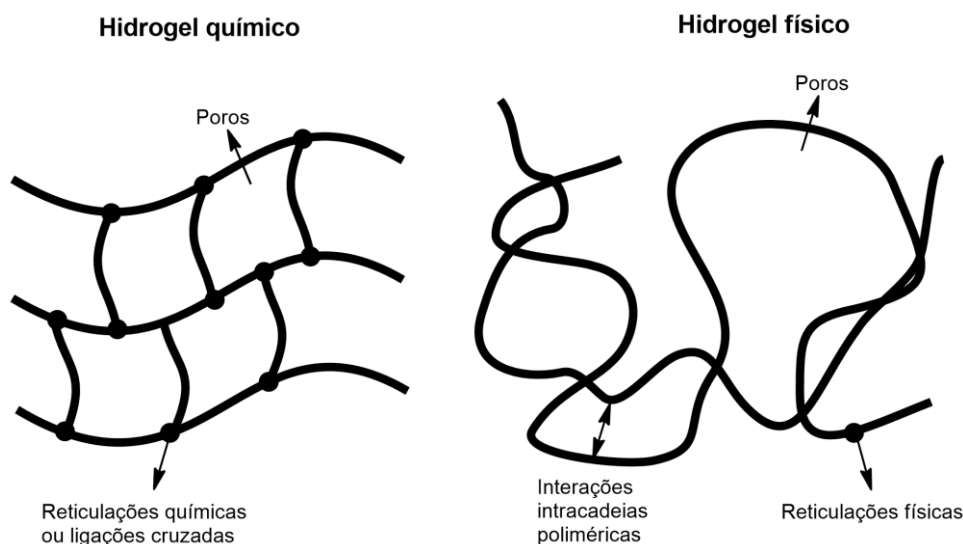


Figura 9: Representação de hidrogéis reticulados quimicamente (esquerda) e fisicamente (direita).

A densidade de reticulação está diretamente relacionada às propriedades dos hidrogéis, como o módulo de elasticidade, o intumescimento e a difusibilidade. Observa-se que o aumento da densidade de reticulação causa uma diminuição no intumescimento e difusibilidade visto que há uma redução da malha, bem como há um aumento no módulo de elasticidade do hidrogel⁹⁷.

2.2.2 Composição Polimérica

Um hidrogel também pode ser classificado pela sua composição polimérica, podendo ser homopolimérica, copoliméricas, redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN) ou interpenetrantes (IPN).

Homopolímeros são polímeros formados por um único monômero e copolímeros são polímeros formados por mais de um monômero, os quais podem se agrupar de forma aleatória, em blocos ou alternados⁹⁸.

Em hidrogéis interpenetrantes e semi-interpenetrantes, mostrados na Figura 10, a rede é formada por dois ou mais polímeros. No caso de redes interpenetrantes o hidrogel é formado pela reticulação de um polímero em outro polímero, já reticulado. Em redes semi-interpenetrante, o hidrogel é formado com a presença de um polímero interno à rede formada^{98,99}.

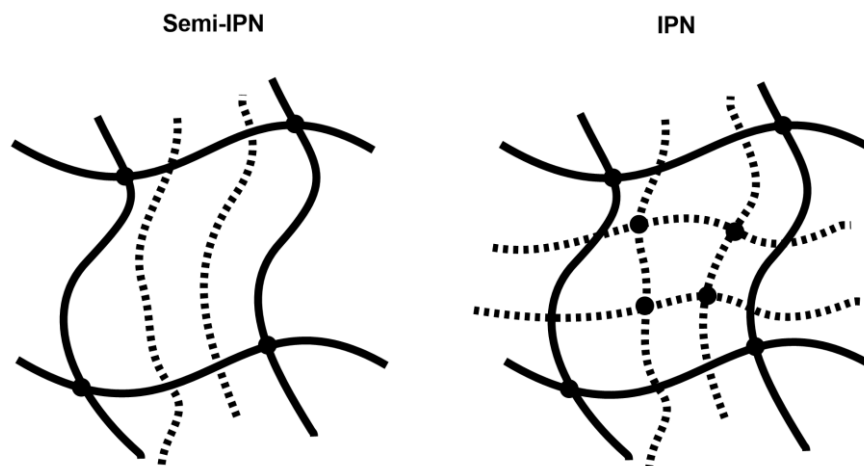


Figura 10: Redes semi-interpenetrante (esquerda) e interpenetrante (direita) dos hidrogéis.

2.2.3 Métodos de preparação

Diversos métodos de preparação de hidrogel são conhecidos e novos métodos são reportados com frequência na literatura. Portanto, serão citados apenas alguns exemplos dos métodos de preparação de hidrogéis, que são por interações iônicas, ligações de hidrogênio e complexos polieletrólíticos, e a preparação de hidrogéis químicos pode ser pela utilização de agentes reticulantes e polimerização radicalar.

2.2.3.1 Interações iônicas

Esse método de preparação consiste na adição de íons bi ou tri valentes podendo interagir com contra íons do polímero, formando a rede do hidrogel¹⁰⁰. A Figura 11 mostra a interação de ácidos carboxílicos com cátion Ca^{2+} .

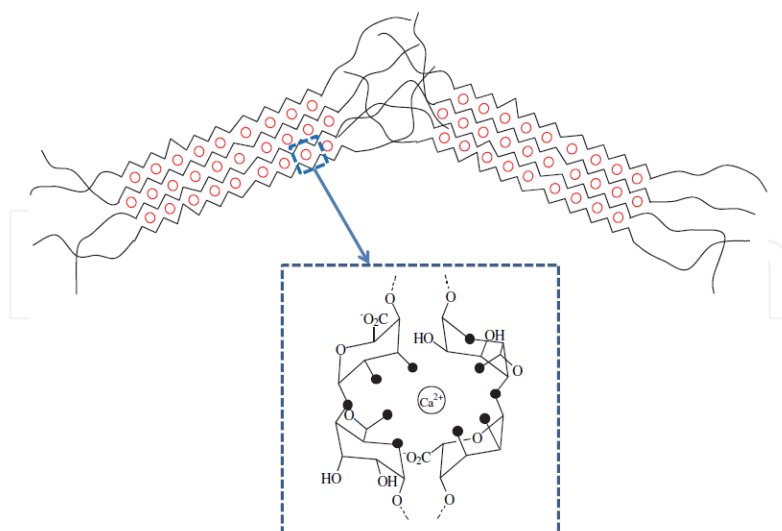


Figura 11: Esquema de interações de grupos $-COO^-$ com contra íon Ca^{2+} . Imagem retirada e adaptada da referência [100].

2.2.3.2 Ligações de hidrogênio

Hidrogéis formados por ligações de hidrogênio podem ser obtidos com a diminuição do pH de uma solução aquosa contendo o polímero com grupos carboxílicos, mostrado na Figura 12¹⁰⁰.

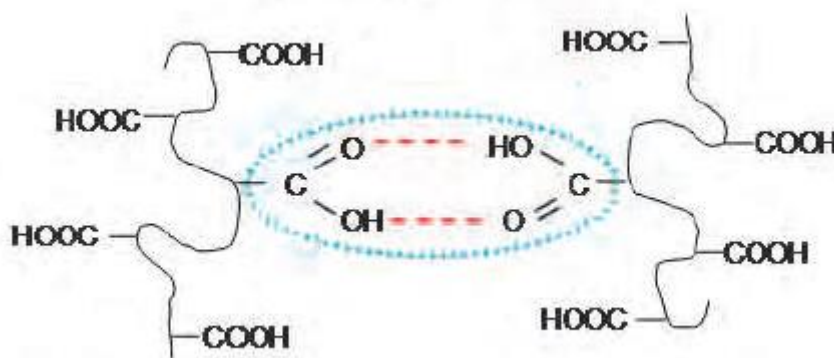


Figura 12: Ligação de hidrogênio entre grupos carboxílicos dos polímeros. Imagem adaptada da referência [100].

2.2.3.3 Complexos polieletrólíticos

Hidrogéis com complexos polieletrólíticos são formados pela mistura de ânions e cátions à solução, permitindo com que o hidrogel sustente-se pela interação dos íons de cargas opostas, formando complexos solúveis ou insolúveis de acordo com o pH do meio¹⁰⁰. O esboço das interações iônicas em um hidrogel polieletrólítico é mostrado na Figura 13.

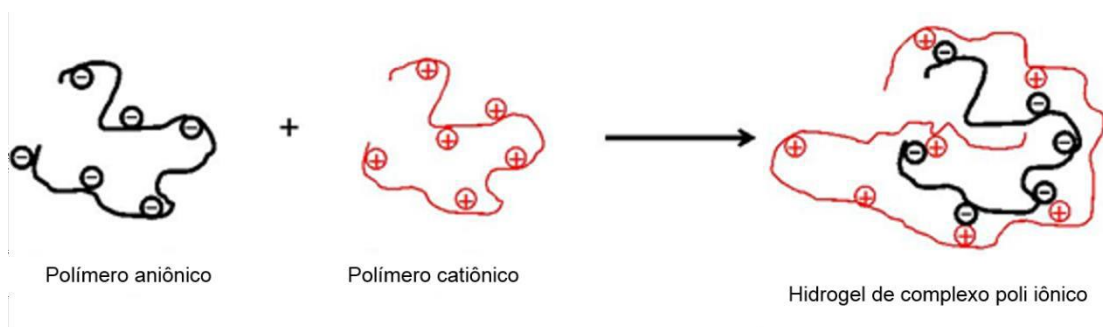


Figura 13: Esquema de interação iônica em um hidrogel polieletrólítico. Imagem retirada e adaptada da referência [100].

2.2.3.4 Agentes Reticulantes

A utilização de agentes reticulantes envolve a adição de moléculas bifuncionais à cadeia polimérica. Essas moléculas reagem com as cadeias poliméricas, formando “pontes” entre duas cadeias e, portanto, formam o hidrogel^{100,101}. A Figura 14 mostra a reação de reticulação do PVA ao ser adiciona o agente reticulante glutaraldeído, formando o hidrogel.

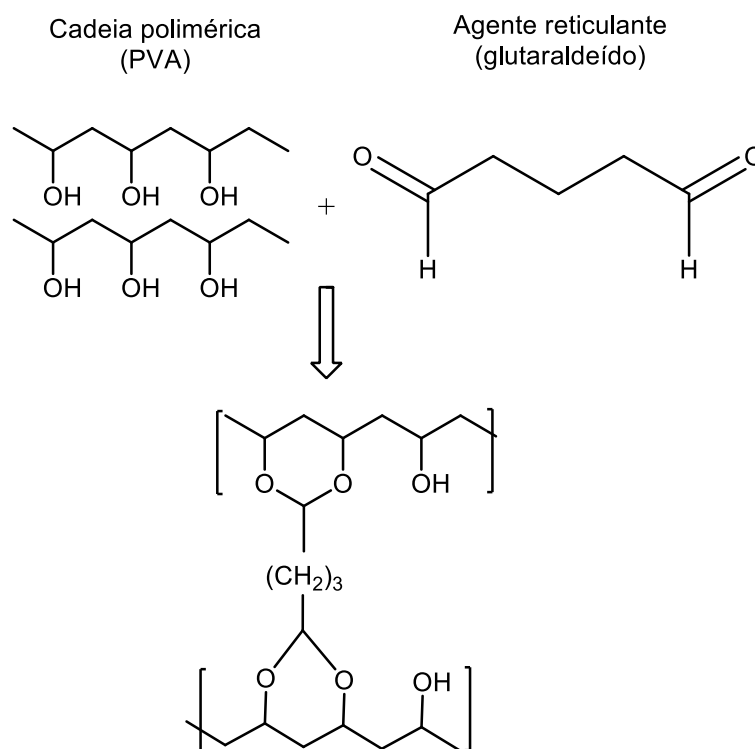


Figura 14: Hidrogel de poli(álcool vinílico) (PVA) formado pela adição do agente reticulante glutaraldeído. Imagem adaptada da referência [100].

2.2.3.5 Polimerização em Cadeia

A formação de hidrogeis por polimerização radicalar se destaca dentre os métodos de preparação por ser um método rápido e simples de ser realizado, pois requer condições brandas. O método envolve a adição de iniciadores químicos na solução de polímero funcionalizado com grupos reticulantes. A iniciação da reação pode ser feita por radiação, temperatura e agentes ativadores¹⁰².

Essa técnica de polimerização acontece em três etapas: iniciação, propagação e término, mostradas na Figura 15. A etapa de iniciação é normalmente realizada pela inserção de iniciadores termicamente instáveis, formando dois centros ativos. O radical ativo ataca a dupla ligação do monômero, transferindo o centro ativo, dando início a etapa de propagação. Durante a propagação há a transferência do centro ativo de monômero a monômero, fazendo com que a cadeia cresça à uma velocidade altíssima. A interrupção do crescimento da cadeia se deve pelo desaparecimento do centro ativo, que pode ocorrer por diversas maneiras pois depende do tipo de monômero e as condições reacionais¹⁰³.

A terminação pode ocorrer quando os centros ativos de duas cadeias poliméricas se encontram e reagem covalentemente, gerando uma cadeia morta de alta massa molecular, acontecendo com mais frequência em reações com moléculas de baixo impedimento estérico. Quando um grupo lateral R é volumoso e os centros ativos se encontram, há o favorecimento da transferência intermolecular de um hidrogênio do segundo carbono do monômero ao carbono do centro ativo de outra cadeia polimérica, gerando uma instauração em uma das cadeias poliméricas, e um carbono saturado em outra. Durante o crescimento de uma cadeia pode acontecer, também, a abstração de um próton de um ponto qualquer de uma outra cadeia, transferindo esse centro ativo para essa nova cadeia, permitindo a formação de ramificações longas na mesma, porém, interrompendo o crescimento da outra cadeia. Quando a reação acontece em um meio com outras moléculas reativas (solventes e contaminantes, por exemplo), pode haver a transferência de átomos para o centro ativo da cadeia e, conseqüentemente, interrompendo o seu crescimento¹⁰³.

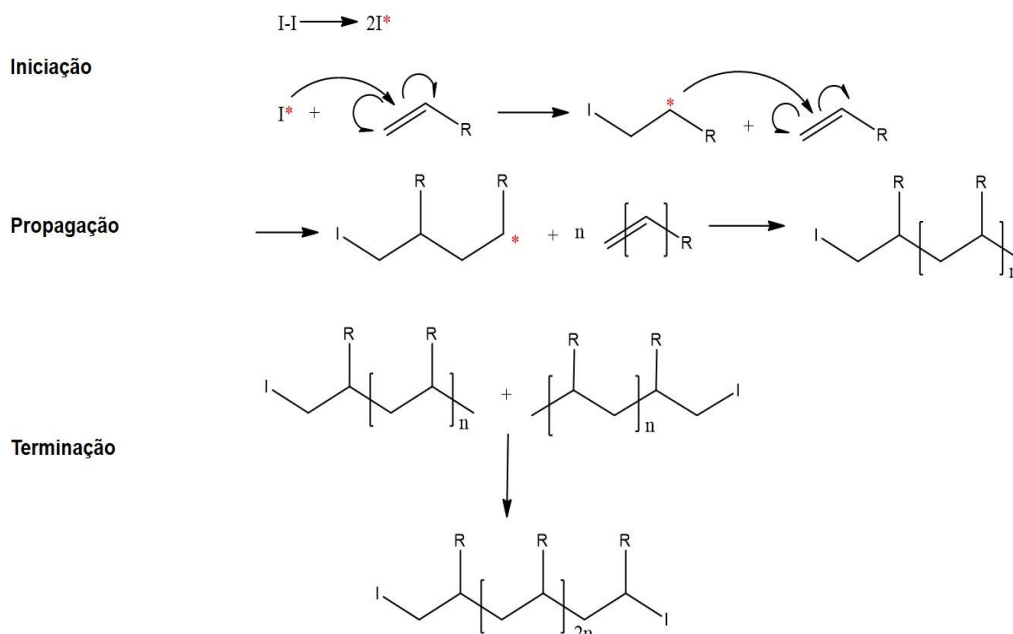


Figura 15: Etapas de uma reação de polimerização radicalar.

2.2.4 Matéria Prima

2.2.4.1 Polímeros Naturais

Polímeros naturais, ou biopolímeros, são polímeros que ocorrem na natureza geralmente formados por processos metabólicos nos organismos que permitem o crescimento de cadeias a partir de monômeros ativados ou por ação enzimática. São biopolímeros as proteínas e os carboidratos e são classificados em três grupos de acordo com sua origem: polinucleotídeos, polipeptídeos e polissacarídeos¹⁰⁴.

Os biopolímeros de fonte polipeptídica são as proteínas, formadas por uma ou mais cadeias de aminoácidos que, ao interagirem, formam proteínas com vários níveis de complexidade, explanadas anteriormente, bem como suas diversas aplicações, e elucidadas na Figura 3. Exemplos desses biopolímeros são as proteínas colagenosas, gelatina, elastina e fibrina, glúten, caseína.

Polissacarídeos, ou glicanos, possuem esse nome pois são formados por cadeias de monossacarídeos: glicose, galactose, arabinose, manose, frutose, furano e pirano. Dentre os monossacarídeos citados o mais conhecido e estudado é a glicose, pois este é fundamental na formação de polissacarídeos como celulose, amido, sacarose, lactose e maltose, bem como participa de funções metabólicas nas células visto que é a principal fonte de energia ao ser

catabolizado durante o processo de respiração celular. Os polissacarídeos podem ser extraídos de diversas fontes: gomas, agar, pectina, celulose de algas e plantas; quitina, quitosana e ácido hialurônico de origem animal; xantana, dextrana, levan de bactérias; acetoglicérides, graxas e surfactantes de glicolípídeos¹⁰⁴.

Esses polímeros naturais apresentam algumas vantagens sobre polímeros sintéticos por possuírem ótima biocompatibilidade e características semelhantes à matriz extracelular. Apesar de vantajoso de um ponto de vista celular, os biopolímeros possuem propriedades mecânicas difíceis de serem controladas, o custo de isolamento e purificação é normalmente maior e, portanto, sua reprodutibilidade laboratorial é menor¹⁰⁵.

2.2.4.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero de origem natural muito utilizado na área médica. Esse polímero pode ser obtido pela desacetilação da quitina (Figura 16), polímero normalmente extraído do exoesqueleto de crustáceos e insetos, e encontrado também na parede celular de fungos e micro-organismos¹⁰⁶.

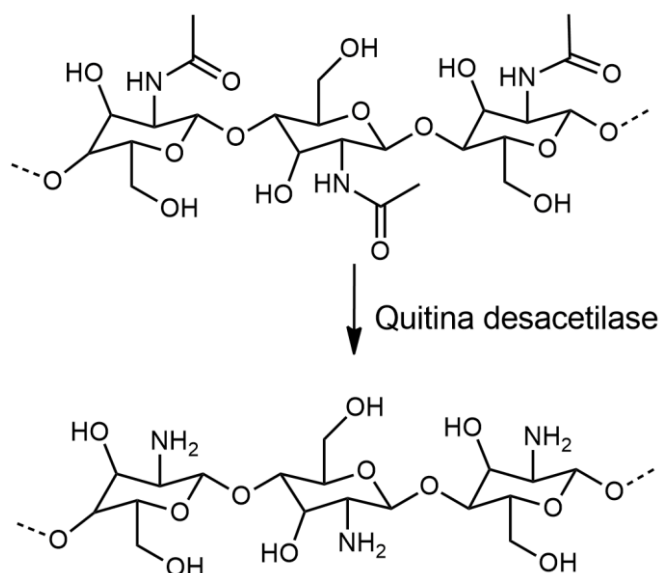


Figura 16: Reação enzimática de desacetilação da quitina.

É um biopolímero conhecido especialmente por suas propriedades antibacterianas, mas também por ser atóxico e apresentar um alto grau de cristalinidade, oriundo de interações inter a intramoleculares fortes devido à

presença de grupos hidroxila, amina e acetamida em sua estrutura. Além disso, esse polímero é biodegradável e biocompatível e, portanto, possui ampla utilização em diversas áreas de interesse^{106,107}.

Na cardiologia a quitosana, juntamente a gelatina e poliuretano, é utilizada na formulação de folhetos válvulas coronárias biomiméticas por *electrospinning*¹⁰⁸; na área dermatológica é utilizada na produção de *scaffolds* que proporcionam às células epiteliais ambiente ideal que auxilia na cicatrização de feridas¹⁰⁹; quitosana e genipina reticulados apresentam boa adesão de neuroblastomas, apresentando potencial para ser utilizada em regeneração neural¹¹⁰; compósitos de gelatina e quitosana apresentam boa absorção de água e permeabilidade ao oxigênio, sendo utilizados como lentes de contato¹¹¹.

2.2.4.3 Polímeros Sintéticos

Os polímeros sintéticos apresentam algumas vantagens sobre biopolímeros, pois não necessitam passar por um processo de extração e isolamento que costumam ter gastos e tempos de extração elevado¹¹². Polímeros sintéticos amplamente utilizados na formulação de hidrogéis são polietilenoglicol (PEG), poli(acrilamida) (PAAm), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(álcool vinílico) (PVA), poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA) e poli(*N*-isopropil acrilamida) (PNiPAAm). Dentre os polímeros citados, o PEG se destaca por possuir baixa toxicidade e imunogenicidade, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)* para a formulação de materiais que entrem em contato com o corpo^{105,112}.

Hidrogéis constituídos de PEG são muito estudados para a construção de matrizes em engenharia de tecidos e medicina regenerativa devido às suas propriedades mecânicas definidas, porosidade e biocompatibilidade. Entretanto, esses hidrogéis não são biodegradáveis e não apresentam sítios de adesão celular¹¹³.

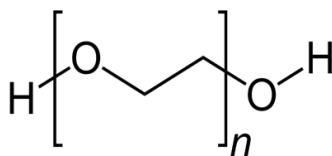


Figura 17: Estrutura química da unidade repetitiva do polietilenoglicol.

A fim de aprimorar sua interação com meios biológicos, os hidrogéis de PEG podem ser modificados com determinados grupos, uma vantagem apresentada pela estrutura do polímero, mostrado na Figura 17. Essa facilidade de modificação permite aperfeiçoar suas propriedades mecânicas e biológicas, permitindo também uma variedade maior de funções. Outra forma de modificar os hidrogéis de PEG é pela formação de hidrogéis conjugados com biopolímeros, como colágeno, quitosana, alginato, gelatina, matriz extracelular e entre outros que apresentam propriedades químicas, físicas e biológicas interessantes para diversas áreas de estudo^{93,113–115}.

2.2.5 Aplicações de Hidrogéis

Os hidrogéis se caracterizam por sua estrutura tridimensional porosa, excelente absorção de fluidos e propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos, que os tornam capazes de criar um ambiente ideal para adesão e crescimento celular e sua porosidade permite a vascularização de novos tecidos^{116,117}.

Esses materiais possuem características mecânicas ajustáveis através do agente reticulante ou composição química, alterando o grau de reticulação ou intumescimento. Essas propriedades ajustáveis atraem maior interesse no estudo de interações mecânicas celulares, uma vez que estas interações são muito complexas entre si¹¹⁸.

Diversas aplicações biomédicas vêm sendo estudadas para os hidrogéis, como *scaffolds* em engenharia de tecidos e liberação controlada de fármacos. Para cada uma destas aplicações os hidrogéis deverão apresentar propriedades mecânicas distintas. Por isso, a compreensão e quantificação adequada destas propriedades, tais como o módulo de equilíbrio e o tempo de gelificação, é de fundamental importância para os estudos com este material¹¹⁸. Outro fator importante em aplicações biomédicas é a capacidade de intumescimento dos hidrogéis, visto que há uma diminuição na energia de Gibbs interfacial com a

presença de água e, portanto, há uma melhora nas suas propriedades biológicas¹¹⁹.

A hidratação de um hidrogel ocorre em duas etapas distintas: um processo de difusão seguido de relaxamento. Primeiramente, as regiões hidrofílicas do hidrogel são hidratadas pelas moléculas de água, momento em que se nota o maior crescimento do hidrogel. Em seguida, a pressão osmótica das cadeias reticuladas permite que a rede absorva mais água¹².

Os fatores que influenciam na capacidade de absorção do hidrogel são o grau de reticulação, a natureza de seus constituintes, a natureza da solução e a estrutura tridimensional. Dentre esses, a densidade de reticulação é um dos fatores mais importantes, a qual é determinada pelo número de ligações cruzadas em determinado volume. Quanto mais ligações cruzadas num volume, maior a densidade de reticulação. A Figura 18 apresenta a cinética de intumescimento de hidrogéis^{120,121}.

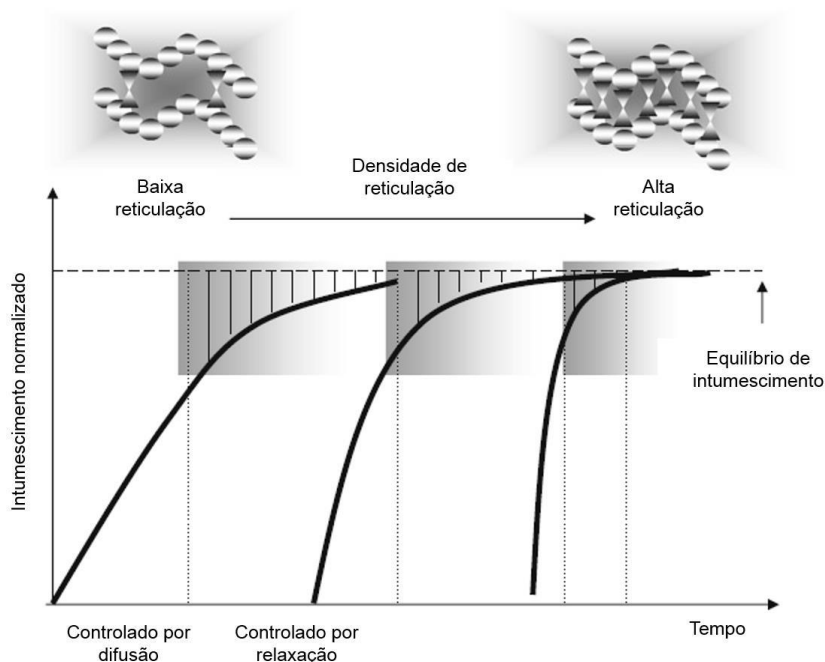


Figura 18: Cinética de intumescimento de hidrogéis. Imagem tirada da referência [120].

Outra abordagem adotada por pesquisadores com o intuito de aprimorar a capacidade responsiva de hidrogéis a determinados estímulos celulares é a bioconjugação de hidrogéis, muitas vezes utilizando-se de proteínas e peptídeos por possuírem alta afinidade celular. Propriedades como adesão, migração,

proliferação e diferenciação celular podem ser controlados a partir dessa abordagem e, portanto, é uma técnica de muito interesse para áreas como engenharia de tecidos e medicina regenerativa. A Figura 19 mostra como ocorre a interação de um hidrogel bioconjugado com as células, onde as biomoléculas auxiliam na interação do suporte sintético com o meio biológico¹¹³.

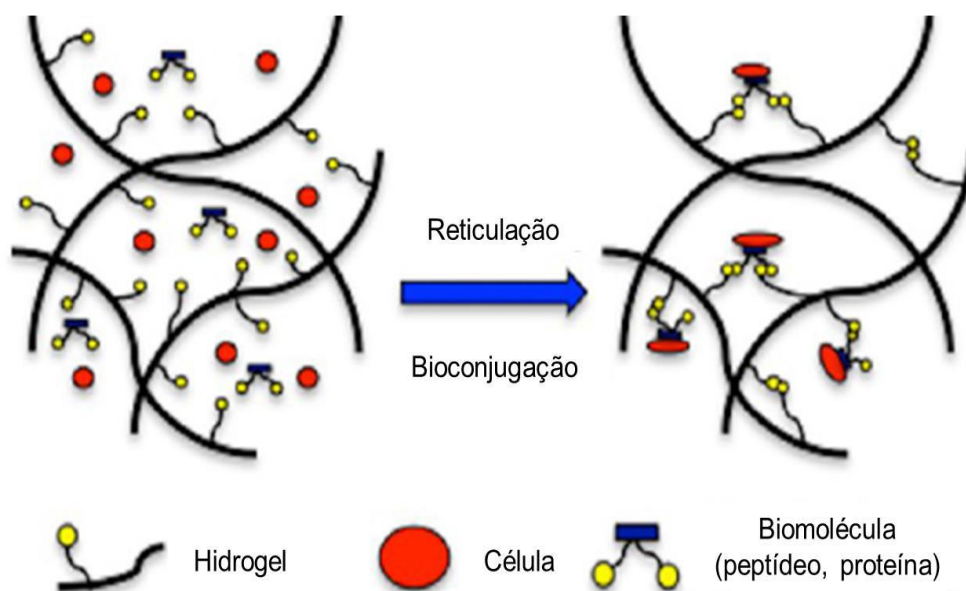


Figura 19: Esquema mostrando a bioconjugação entre o scaffold com as células em um hidrogel. Imagem retirada e adaptada da referência [113].

Ao contexto do presente trabalho, as utilizações de hidrogéis de colágeno são muito variadas. Pourjavadi *et al.* desenvolveram um hidrogel de colágeno altamente poroso a partir da neutralização do enxerto poli(acrilamida-co-ácido acrílico) após formação do gel utilizando agente reticulante *N,N*-Metileno-bisacrilamida (MBA). Os resultados obtidos mostraram que os hidrogéis são superabsorventes e altamente sensíveis ao pH, variando a capacidade de absorção de líquidos ao variar o pH da solução. Portanto podem ser considerados mais adequados à utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos¹²².

Helary *et al.* prepararam hidrogéis de colágeno concentrados a 1,5, 3 e 5 mg mL⁻¹ para estudar o efeito da concentração de colágeno em uma cultura de fibroblastos da derme como um substituto à pele. O resultados obtidos mostram que os hidrogéis que possuíam uma concentração de 3 mg mL⁻¹ de colágeno e

fibroblastos apresentavam-se como bons candidatos à substitutos de pele por serem facilmente manuseados e promovem bom crescimento celular¹²³.

Lou *et al.* prepararam hidrogéis de colágeno e ácido hialurônico com objetivo de estudar o efeito de relaxamento do sistema interpenetrante, mostrando que há duas fases de relaxamento no sistema: a do colágeno e do ácido hialurônico. A fase de relaxamento do colágeno há um realinhamento das fibras, causado por uma relaxação global do ácido hialurônico, fase da qual é promovida difusão celular, e formação de focos de adesão, que demonstra a capacidade de sistemas interpenetrantes em mimetizar matriz extracelular¹²⁴.

Nakaji-Hirabayashi *et al.* apresentaram um trabalho que visa a cultura e sobrevivência de células neurais em hidrogéis de colágeno que possuem peptídeos derivados da laminina. Os resultados obtidos mostraram que o hidrogel apresenta boa viabilidade para células-tronco neurais ao serem transplantadas no corpo estriado de ratos saudáveis, apresentando um precursor para futuras terapias à doença de Parkinson¹²⁵.

Wang *et al.* avaliaram a viabilidade de se utilizar hidrogéis constituídos por colágeno/quitosana e reticulante glioxal embutidos de células tronco da medula óssea. Os resultados mostram o glioxal como uma opção ao β -glifosato como agente reticulante, pois apresenta baixa toxicidade e suporta a proliferação e atividade das células tronco¹²⁶.

Rafat *et al.* apresentaram um hidrogel de colágeno e quitosana estabilizado por carbodiimida ou poli(etilenoglicol) dibutiraldeído (PEG-DBA) para implantes de córnea. Os resultados obtidos mostram que o material possui resistência, elasticidade, compatibilidade celular e claridade adequada para serem utilizados em implantes de córnea por testes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (implantes de ratos e porcos)¹²⁷.

Sargeant *et al.* desenvolveram um hidrogel injetável a base de colágeno e PEG com propriedades mecânicas ajustadas às propriedades nativas dos tecidos. Os resultados mostram que a componente colagenosa do hidrogel permite a adesão celular e degradação enzimática, bem como o PEG permite a ligação de proteínas e tecidos, viabilizando a utilização desse material como

scaffold na regeneração de tecidos e, portanto, reduzindo a complexidade de procedimentos invasivos¹²⁸.

2.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os hidrogéis tem enorme potencial e são alvo de intensa pesquisa ao longo de muitos anos, em parte por razões fundamentais e em parte devido ao potencial para uma ampla gama de formulários. Os hidrogéis têm sido utilizados com sucesso em campos biomédicos por apresentarem alto teor de água e consequente biocompatibilidade estimada. Eles são utilizados de lentes de contato a sistemas mais complexos de liberação controlada de medicamentos^{129,130}.

Para determinar a viabilidade de um produto cosmético, farmacêutico e materiais bioresponsíveis para uso do ser humano, é necessário que esse produto seja avaliado de acordo com sua resposta biológica, a fim de eliminar eventuais efeitos adversos que podem ser causados à saúde do usuário. Na prática, produtos cosméticos raramente estão associados à danos à saúde a curto e médio prazo, no entanto a exposição prolongada à um produto pode apresentar complicações.

Biomateriais e seus diversos sistemas de administração objetivam interagir com o corpo humano para substituir, tratar, ou modular a função fisiológica de um determinado tecido, sempre visando uma resolução regeneradora. Seja sintético ou natural, os biomateriais devem ser avaliados antes que um dispositivo final chegue ao mercado e seja usado clinicamente. A escolha de materiais e estudos de biocompatibilidade conducentes à fabricação e, finalmente, a aprovação para venda no mercado.

Normas internacionais, como ISO 10993, são geralmente empregadas para comprovar a regulamentação e conformidade necessária para liberação do mercado ou para iniciar testes *in vitro* e posteriormente *in vivo*. As aplicações médicas dos polímeros incluem equipamentos de proteção individual, instrumentos, dispositivos implantáveis, sistemas de transferência e armazenamento de líquidos biológicos, órgãos, suturas, sistemas de administração de medicamentos, portadores de células ou enzimas, dispositivos microfluídicos, biossensores, ferramentas de diagnóstico *in vitro*, bio-adesivos;

aparelhos ortopédicos e muitos outros. As avaliações de biocompatibilidade visam prever se um material pode apresentar algum potencial perigo para os pacientes através da avaliação de condições muito semelhantes às clínicas. Para minimizar a utilização de ensaios em animais, métodos *in vitro* vem surgindo como uma opção viável para determinação de algum composto potencialmente tóxico presente nos produtos^{131,132}.

Para avaliar a viabilidade de um produto, este deve ser submetido aos ensaios referentes à sua possível utilização no mercado. Alguns ensaios muito empregados são os de irritabilidade dérmica, irritabilidade ocular, fototoxicidade, acneigênese, sensibilidade dérmica, teste adjuvante completo de Freund (TACF), citotoxicidade, adesão direta e indireta.

O presente trabalho visa avaliar a viabilidade celular dos hidrogéis preparados do colágeno extraído da pele de tilápia para uma possível utilização a medicina regenerativa, portanto trata com prioridade os ensaios de citotoxicidade e adesão celular *in vitro* como ensaios preliminares de biocompatibilidade, de acordo com a ISO-10993¹³³.

2.3.1 Adesão Celular

Adesão celular possui um papel importante na manutenção de tecidos visto que é fundamental na regulação e comunicação celular. É definida pela capacidade de uma célula aderir a outra célula ou aderir um substrato. A matriz extracelular funciona como o substrato fisiológico nos tecidos, sendo composta basicamente por água, proteínas e polissacarídeos. A matriz extracelular é o componente que provém os aspectos fundamentais na estrutura histológica para as células, e também inicia processos bioquímicos e biomecânicos cruciais para a morfogênese do tecido, diferenciação celular e homeostase. Dessa forma, alinhando estrutura com função fisiológica, a matriz é heterogênea nos seus componentes, além dos básicos, e altamente dinâmica¹³⁴.

O ensaio de adesão está associado ao entendimento das interações celulares e seu comportamento em organismos multicelulares. Portanto, está associado a estímulos que regulam diferenciação, ciclo, migração e sobrevivência celular. Variações na capacidade de adesão celular estão

associadas a uma grande variedade de doenças como artrite, câncer, osteoporose e aterosclerose¹³⁵⁻¹³⁷.

A capacidade de adesão pode variar de acordo com a aplicação do material. Por exemplo, biomateriais desenvolvidos para utilizações biomédicas que entram em contato com sangue não podem ser aderentes às proteínas e células plasmáticas para evitar trombose e embolismo. Por outro lado, materiais utilizados como *scaffolds* na engenharia de tecidos necessitam agir como substratos para promover adesão celular e subsequente proliferação e biossíntese¹³⁶.

As células transmitem informação extra e intracelular a partir de sítios de adesão em outras células ou matriz extracelular. Os sítios são formados por proteínas chamadas integrinas, que ancoram as células à matriz ou à outras células de adesão. Tanto as integrinas quanto as moléculas de adesão são anexadas a filamentos de actina em uma adesão focal, como pode ser observado na Figura 20. Essa adesão é chamada adesão focal (*FA – Focal Adhesion*), processo em que há formação de complexos macromoleculares que transmitem forças mecânicas e sinais regulatórios entre a matriz e as células aderidas¹³⁵.

Em um processo de adesão passiva *in vitro* é necessário um meio de cultura celular estático. Durante o período de adesão estática, as células são submetidas a alterações morfológicas coordenadas por deformações passivas e reorganização do citoesqueleto, as integrinas fornecem tanto ligamento mecânico entre actina do citoesqueleto e a matriz quanto sinalização transmembranar. A ligação entre as integrinas com as proteínas da matriz estimulam a ação da *Rho GTPases*, família de proteínas sinalizadoras que estimulam a proliferação e migração celular e formação de sítios de adesão focal^{135,138}.

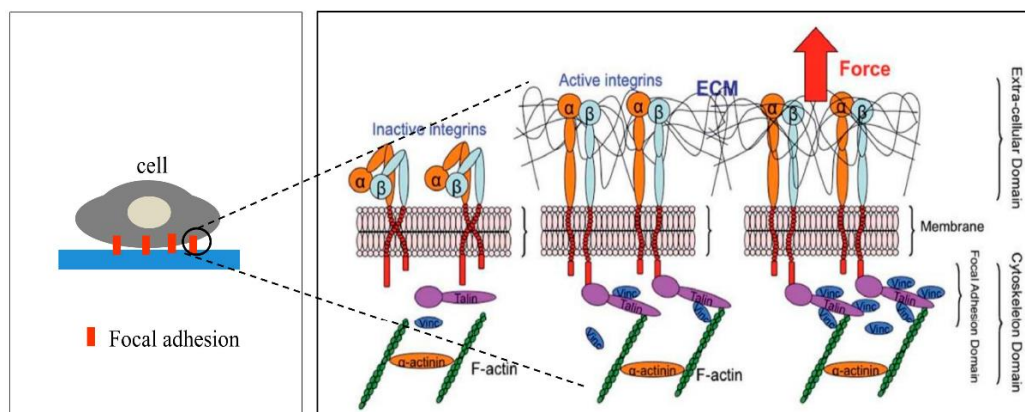


Figura 20: Representação esquemática da formação do sistema ECM-Integrina-Citoesqueleto em sítios de adesão focal. Imagem retirada da referência [136].

Portanto, o processo de adesão *in vitro* consiste em três etapas distintas: ligação entre corpo celular e substrato; achatamento e espalhamento do corpo celular sobre o substrato; e a organização da actina com formação da adesão focal entre as células e o substrato¹³⁵.

As interações mecânicas das células e substrato podem influenciar e controlar o comportamento celular e suas funções. De modo geral, os estudos de adesão celular podem ser categorizados em dois eventos distintos: o ligamento e o desligamento das células na matriz. Portanto, é possível determinar as propriedades de adesão pelo tempo estudando os tempos de contato¹³⁵.

Ao contexto do presente trabalho, ressalta-se a importância da técnica de quantificação da força de tração tridimensional (3D-TFM) ao se estudar os eventos de adesão celular.

A técnica 3D-TFM consiste no cultivo de células individuais sinalizadas por marcadores fluorescentes dentro de uma matriz tridimensional, normalmente utilizando hidrogéis, colágeno, agarose, fibrina e entre outros. Diferentemente de uma matriz bidimensional, a migração e consequente proliferação das células em 3D-TFM só ocorrem quando as células exercem uma força de tração que supere o impedimento estérico. Portanto, as proteínas de adesão focal são difundidas e distribuídas ao longo do citoplasma, sendo responsáveis por modular a mobilidade celular e, conseqüentemente, não formam agregados celulares na matriz¹³⁵⁻¹³⁷.

Os métodos de fluorescência apresentam benefícios por proporcionar observação em tempo real, é flexível quanto à ajustes químicos e mecânicos, responde bem à uma grande variedade de células. Sua desvantagem inclui a necessidade de um microscópio confocal de ponta, alto processamento computacional e incertezas no rastreamento de marcadores fluorescentes¹³⁵⁻¹³⁷.

O evento de desligamento das células em uma matriz ocorre quando há presença de uma força capaz de quebrar as ligações químicas que promovem a adesão focal, podendo quantificar a força de adesão das células. Esse equilíbrio entre as forças de tensão entre célula e o substrato, culminando na adesão ou desligamento, serve de base para um melhor entendimento sobre a biocompatibilidade do material¹³⁵⁻¹³⁷.

Para visualizar a adesão da célula ao substrato podem ser utilizados vários marcadores fluorescentes, sendo um dos mais comuns o 4',6'-diamino-2-fenil-indol, chamado de DAPI, cuja utilização começou majoritariamente na década de noventa como um proeminente marcador nuclear para a visualização das células, inicialmente proposto para citologia e bioquímica¹³⁹. Este é um intercalante de DNA em regiões Adenina-Timina, com grande estabilidade de ligação e utilizado para analisar o contato célula-célula assim como adesão em diversos campos de atuação, da fertilização humana¹⁴⁰, a migração celular¹⁴¹ até a adesão e proliferação das células em Biomateriais^{142,143}. No contexto do presente trabalho, a adesão das células aos biomateriais foi quantificada através da fluorescência por DAPI.

2.3.2 Citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade definem o potencial de degeneração ou morte celular provocado por algum componente da matriz. Ensaio *in vitro* de produtos químicos mostram diferentes mecanismos das quais podem provocar morte celular como a destruição a membrana plasmática, inibição de síntese proteica, ligação com receptores e inibição de reações enzimáticas. Portanto, é de interesse dos pesquisadores determinar a viabilidade celular da matriz utilizada ao analisar funções celulares como permeabilidade, atividade enzimática, aderência celular, produção de adenosina trifosfato (ATP), produção de coenzimas, atividade nucleotídica¹⁴⁴.

Há diversas classificações de ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular; exclusão de corante, ensaios colorimétricos, ensaios fluorimétricos e ensaios luminométricos¹⁴⁴. O presente trabalho dará foco aos ensaios colorimétricos para avaliar a viabilidade celular, em especial ensaios de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide).

O ensaio de MTT foi descrito por Mosmann *et al.* em 1983, propondo um método alternativo à técnicas de exclusão de corante, visto que esta pode conter incertezas na mensuração de células saudáveis, e também possui mais etapas, aumentando o tempo da análise¹⁴⁵. Portanto, sais tetrazólio surgem como uma alternativa para viabilidade celular, visto que eles medem a atividade de enzimas mitocondriais desidrogenases e redutases apenas em células saudáveis^{144,145}.

A determinação da viabilidade celular por esse ensaio envolve as funções mitocondriais, organelas responsáveis pela produção de energia por respiração celular. Nesse ensaio, o reagente de coloração amarela e solúvel em água MTT é reduzido pelas desidrogenases com a coenzima NADH, forma reduzida da coenzima NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), de células saudáveis em formazan (Figura 21), composto de coloração roxa e insolúvel em água, que pode ser quantificado por sua absorbância em comprimentos de onda específicos¹⁴⁴.

Os ensaios de MTT é um dos métodos mais comuns para se determinar a viabilidade celular e citotoxicidade principalmente por ser rápido, seguro e alta reprodutibilidade. No entanto, a formação de um sólido insolúvel com a redução do MTT faz-se necessário o uso de solventes orgânicos como DMSO (dimetil sulfóxido) ou isopropanol para solubilizá-lo, além de dificultar a remoção do meio de cultura dos poços e, conseqüentemente, causando morte celular e impossibilitando utilização subsequente do meio de cultura¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

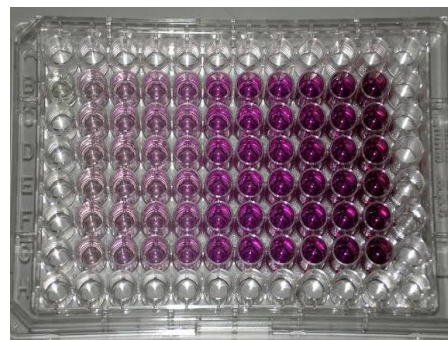
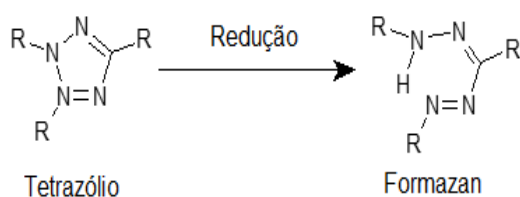


Figura 21: Reação de redução de um sal tetrazólio genérico em formazan, composto de coloração roxa, mostrado à esquerda. A tonalidade da cor indica a quantidade de células em cada poço, visto que maior a quantidade de células, mais escuro será sua tonalidade.

A homeostase bioenergética é fundamental para todas as células, sendo realizada nas mitocôndrias através da fosforilação oxidativa, a qual é necessária para a produção de ATP. A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o O_2 é reduzido a H_2O , por elétrons doados por NADH e FADH_2 , que fluem por vários pares de redução-oxidação, ocorrendo concomitantemente a produção de ATP a partir de ADP e P_i . Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre durante a cadeia respiratória das mitocôndrias, sendo responsável pela maior parte da energia liberada pela célula. O fluxo de elétrons a partir de NADH e FADH_2 até o O_2 (acceptor final de elétrons) se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna com centros redox com afinidade crescente por elétrons. Essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre os equivalentes reduzidos, os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons e o O_2 ^{1,147}.

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q ou ubiquinona. Todos complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons. O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um potencial de membrana. Assim, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana que pode ser utilizado pela ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou

seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente^{1,147}.

As mitocôndrias exercem funções importantes para sobrevivência célula, capazes de produzir energia por oxidação de ácidos graxos, ciclos de Krebs e cadeia respiratória, possibilitando demais atividades celulares, portanto uma diminuição de atividade mitocondrial pode significar até mesmo morte celular causada por fatores externos ou apoptose. Em estágios iniciais de apoptose há perda do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), ocorrendo uma transição de permeabilidade, induzindo a liberação de AIF (*apoptosis inducing factor*). O processo de apoptose é normalmente acompanhado de perda de água, fragmentação de nuclear e encolhimento da célula, o que causam fragmentação e subsequente perda extensiva de DNA, causando morte celular¹⁴⁸.

A mudança de $\Delta\Psi_m$ pode ser avaliada utilizando o reagente JC-1, um corante lipofílico e catiônico, exibindo picos de emissão verde naturalmente (510-520nm), que forma complexos ao permear e acumular na mitocôndria conhecidos como agregados J, que exibem emissão no vermelho (~590 nm). A razão de emissão apresentada pela célula indica, portanto, a atividade mitocondrial, em que uma célula apoptótica e pouco saudável não apresenta formação de J agregados pela perda de carga negativa e aumento da permeabilidade da membrana, mantendo sua emissão natural, enquanto células saudáveis apresentam formação de J agregados e emissão característica destes. Esse método apresenta uma forma de análise tanto quantitativa, avaliando a intensidade de emissão, quanto qualitativa, avaliando a razão de emissão verde:vermelho, do potencial da membrana mitocondrial, complementando os ensaios de MTT para avaliar viabilidade celular^{149,150}.

3 OBJETIVO GERAL

Extrair colágeno a partir de peles do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) e empregá-lo no desenvolvimento de hidrogéis a base de colágeno, quitosana e polietilenoglicol funcionalizado (PEG-MA).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extrair e purificar o colágeno a partir da pele de tilápia;

2. Funcionalizar e caracterizar o PEG com grupos metacrilatos;
3. Preparar hidrogéis com diferentes proporções de colágeno, quitosana e PEG-MA;
4. Realizar ensaios biológicos de citotoxicidade e biocompatibilidade dos hidrogéis obtidos a partir de colágeno/quitosana/PEG-MA em diferentes proporções.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foram empregados os seguintes reagentes: hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido acético, cloreto de sódio, os quais foram adquiridos das empresas Synth, Anidrol, Nuclear e Quimex, respectivamente. O sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), poli(etileno glicol) (massa molar: 20.000 g.mol⁻¹), anidrido metacrílico, quitosana (grau de desacetilação entre 75-85%, massa molar: 190.000-310.000 g.mol⁻¹) e *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED), os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich, a trietilamina (C₆H₁₅N) da Vetec e o persulfato de potássio (PSP - K₂S₂O₈) da Neon. A pele da tilápia foi adquirida na Peixaria Japesca, localizada no Mercado Público de Porto Alegre-RS.

Foram utilizados também tetrahydrofurano (THF), diclorometano (CH₂Cl₂), hexano (C₆H₁₂) adquiridos de diferentes fornecedores locais. As membranas de diálise de celulose com massa molecular de corte de 12 kDa foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

Os ensaios biológicos contaram com a utilização de dihidrocloro de 4',6-Diamidino-2-fenilindole (DAPI), penicilina-estreptomicina e soro fetal bovino, adquiridos da empresa Merck, *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) da Thermo Fisher Scientific e linhagem de células 3T3 da ATCC®.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extração do Colágeno

A pele do peixe foi lavada previamente com água deionizada e armazenada a -20 °C até sua utilização. Para remover as demais proteínas não-colagenosas superficiais, o subproduto foi lavado em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ à uma razão de 10% m/v, deixando-o sob agitação magnética durante 24h e,

em seguida, lavado até o pH da água neutralizar. A remoção dos sais presentes na pele do peixe foi feita deixando-a sob agitação magnética em solução de HCl $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ (proporção de subproduto:solução = 1:15) por 90 minutos e novamente lavados em água deionizada para posterior extração. As peles foram armazenadas à $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do colágeno.

De acordo com os protocolos anteriormente citados, a extração do colágeno foi feita imergindo o subproduto tratado em HAc $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ à uma razão 1:15 e deixando-a sob agitação magnética por 72h. Os produtos foram centrifugados e filtrados. O líquido filtrado (ASC) foi armazenado sob refrigeração e os resíduos sólidos foram descartados. Todas as etapas de extração do colágeno foram realizadas à temperatura ambiente.

4.2.2 Purificação do Colágeno

A purificação das soluções ácidas foi realizada pelo processo de *salting-out*, utilizando uma solução de NaCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido. A proporção utilizada de solução de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ varia de acordo com a quantidade de solução ácida, sendo adicionado o proporcional para que a solução final tenha $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ ⁴⁶. O sal para purificação foi adicionado aos poucos à solução ácida já sob agitação e deixados por 24h. O precipitado foi centrifugado e re-solubilizado em ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, o sobrenadante foi descartado.

O material re-solubilizado em HAc foi dialisado contra água deionizada por aproximadamente uma semana sob refrigeração, trocando a água diariamente. Após a diálise, a suspensão de colágeno foi transferida para um balão de fundo redondo com abertura de 24 mm, liofilizada e, por fim, armazenada sob refrigeração para caracterizações. Os produtos obtidos das etapas de extração do colágeno, desde seu pré-tratamento, são mostrados na Figura 22. A Figura 23 mostra o fluxograma das etapas de extração de purificação do colágeno.

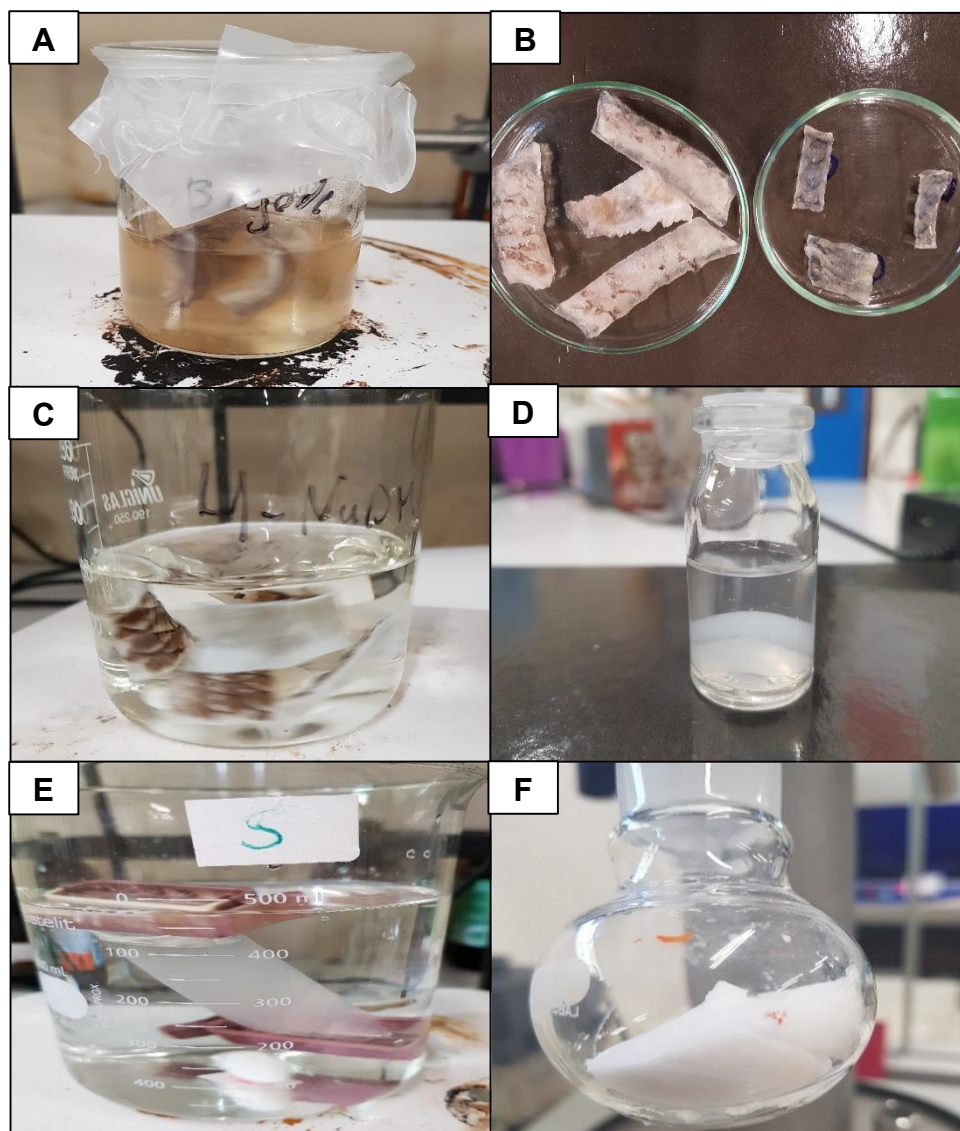
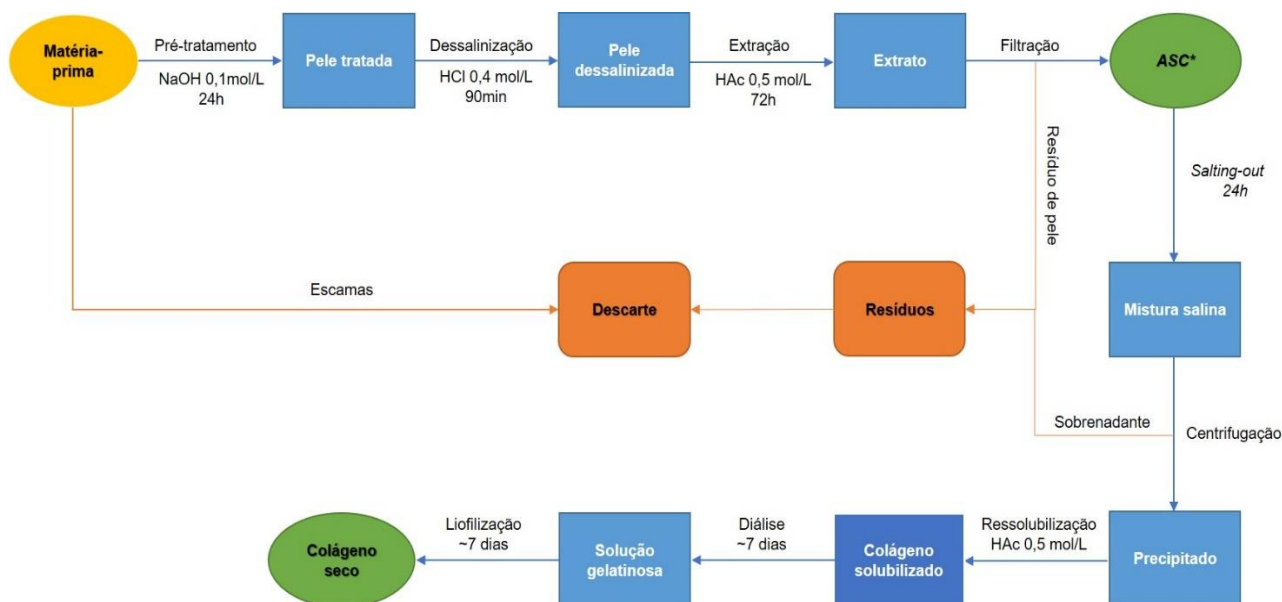


Figura 22: Etapas de extração e purificação do colágeno da pele de tilápia. **(A)** Pré-tratamento da pele de tilápia com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; **(B)** Peles de tilápia após pré-tratamento com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,4 \text{ mol L}^{-1}$; **(C)** Extração do colágeno com HAc $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; **(D)** Precipitado de colágeno; **(E)** Diálise contra água mili-Q do precipitado de colágeno solubilizado em HAc $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; **(F)** Liofilização da solução de colágeno após diálise.



*Acid-Solubilized Collagen

Figura 23: Fluxograma de extração e purificação do colágeno de pele de tilápia.

4.2.3 Funcionalização do PEG com Grupos Metacrilatos (PEG-MA)

Para que haja formação dos hidrogéis através da reticulação a partir dos grupos acrilato e metacrilato, é necessário que o PEG seja funcionalizado. Para tal, o PEG foi solubilizado em diclorometano anidro sob atmosfera inerte, adicionando anidrido metacrílico e trietilamina em seguida. Essa reação foi realizada por 4 dias à temperatura ambiente e agitação constante¹⁵¹.

Após esse período, o diclorometano foi evaporado em um evaporador rotatório e o produto foi solubilizado em THF e precipitado em hexano duas vezes. O sólido obtido foi seco sob vácuo.

4.2.4 Preparo dos Hidrogéis

Foi preparada uma solução de quitosana com concentração de 1% (m/v) em solução aquosa contendo ácido acético 3% (v/v) e duas soluções de HAc contendo colágeno com diferentes concentrações, uma à 4 mg mL⁻¹ e outra, 12 mg mL⁻¹. As soluções de quitosana e colágeno foram misturadas em volumes iguais para obter uma concentração final de 0,5% (m/v)/2 mg mL⁻¹ (quitosana-colágeno) e 0,5% (m/v)/6 mg mL⁻¹ (quitosana-colágeno). As soluções de quitosana-colágeno foram dialisadas contra água deionizada por 72 h, trocando a água diariamente.

Foi pesada uma quantidade equivalente à 5% (m/v), em relação ao volume de solução quitosana-colágeno, de PEG-MA em um balão de fundo redondo e misturado à solução. A reticulação ocorre ao se adicionar o ativador TEMED juntamente com o iniciador PPS a proporção de 1:1, às concentrações de 10 mmol e 15 mmol. A tabela 1 mostra a proporção dos constituintes dos hidrogéis em 1 mL do sistema PEG-Ch-Col.

Tabela 4: Composição dos hidrogéis em 1 mL de solução com diferentes proporções de colágeno, ativador e iniciador.

Concentração dos polímeros			Sistema de iniciadores (SI)		Código
PEG-MA (%m/v)	Quitosana (%m/v)	Colágeno (mg mL ⁻¹)	TEMED (μL)	PSP (μL)	
5	0,5	0	8	90	PEG/Q-10I
		0	12	135	PEG/Q-15I
		2	8	90	PEG/Q-2C-10I
		2	12	135	PEG/Q-2C-15I
		6	8	90	PEG/Q-6C-10I
		6	12	135	PEG/Q-6C-15I

4.3 CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Caracterizações do Colágeno

4.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de colágeno liofilizadas foram metalizadas com ouro e analisadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM – UFRGS) utilizando o microscópio JEOL JSM 6060 com tensão de 7 kV e 10 kV.

4.3.1.2 Dicroísmo Circular (DC)

As análises de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro (JASCO J-815) equipado com uma unidade controladora de temperatura e um acessório de fluorescência. As medidas foram feitas em uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico e os seguintes parâmetros: 100 nm.min⁻¹ para velocidade de escaneamento; 4 segundos para tempo de resposta; 1 nm para largura da banda do feixe e coleta de dados a cada 0,5 nm; faixa de comprimento de onda de 185 nm à 300 nm. A análise foi realizada no

Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia de Massas (LabMMass) da UFSC e apresentada em em apêndice.

4.3.1.3 *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

As análises de DSC foram realizadas em equipamento de análise térmica DSC modelo Q20 da TA Instruments, sob atmosfera de nitrogênio. Para cada análise aproximadamente 5 mg de amostra foram pesadas em painéis herméticos de alumínio e submetidas a uma taxa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹ de 0 °C a 50 °C, seguido do resfriamento na mesma taxa utilizada. Em seguida, a amostra foi submetida a um segundo ciclo de aquecimento e de resfriamento, utilizando as mesmas condições do primeiro ciclo.

4.3.1.4 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

As análises termogravimétricas foram realizadas em um aparelho SDT Q600 TA Instruments, utilizando gás nitrogênio à vazão de 100 mL.min⁻¹ no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT). Para cada análise foram pesados entre 3-5 mg em uma placa de platina e submetidas à uma taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ de 10 °C a 600°C.

4.3.1.5 *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)*

As análises de FTIR-ATR foram realizadas utilizando o equipamento Alpha-P (Bruker) com um prisma de diamante, a 45° e uma resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 24 varreduras para cada amostra. Análise realizada no Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA) da UFRGS.

4.3.1.6 *Eletroforese (SDS-PAGE)*

As amostras contendo colágeno foram preparadas com a adição de tampão de amostra 2X (Tris/HCl pH 6,8, 100 mM, SDS - dodecil sulfato de sódio 4,0%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20% e beta-mercaptoetanol 20 mM). Foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos em banho de aquecimento. O gel de poli-acrilamida foi preparado na concentração de 5% (30% Acrilamida/bis-acrilamida, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% Persulfato de amônio, 0,08% TEMED). Foi adicionado um padrão de massa molar juntamente no gel para comparar com as bandas observadas nas amostras. A eletroforese foi realizada

a 100 V, por aproximadamente uma hora, à temperatura ambiente. O gel foi corado com solução corante (0,25% (m/v) Comassie Blue, 45% metanol, 10% ácido acético) durante um período de cerca de 16 h. Após, o gel foi descorado com solução descorante (metanol 45%, ácido acético 10%). Análise realizada no Laboratório de Proteínas Tóxicas da UFRGS.

4.3.2 Caracterização do PEG-MA

4.3.2.1 RMN de ¹H

A funcionalização do PEG com anidrido metacrílico foi caracterizada através de análises de RMN de ¹H. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos a 400 MHz, em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro interno, utilizando o espectrômetro Bio Spin GmbH (Bruker). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. As amostras foram preparadas solubilizando 20 mg do polímero em 0,75 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃).

4.3.3 Caracterizações dos Hidrogéis

Os hidrogéis preparados foram caracterizados pelo seu grau de intumescimento, MEV, TGA e FTIR. Foram realizados também ensaios biológicos de citotoxicidade e adesão celular para avaliar a viabilidade celular do material.

4.3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O procedimento realizado foi descrito nas caracterizações do colágeno, item 4.3.1.1.

4.3.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

O procedimento de análise termogravimétrica para os hidrogéis corresponde ao descrito no item 4.3.1.4.

4.3.3.3 Grau de Intumescimento (GI)

O grau de intumescimento foi utilizado para avaliar a quantidade de água que os hidrogéis são capazes de absorver. Para isso, os hidrogéis secos foram pesados e colocados em 5 mL de água deionizada (pH ~ 6). O intumescimento dos hidrogéis foi determinado através da pesagem das amostras em diferentes tempos, retirando-se o excesso de água utilizando um papel filtro¹⁵². As análises

foram realizadas em triplicata para determinar o percentual de água absorvido (W) e o grau de intumescimento (Q) dos hidrogéis de acordo com as equações 2 e 3, à temperatura ambiente.

$$W = \left(\frac{M_t}{M_s} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

$$Q = \left[\left(\frac{M_t - M_s}{M_s} \right) \right] \cdot 100 \quad (3)$$

W = Percentual de água absorvida

Q = Grau de intumescimento

Mt = Massa do hidrogel intumescido

Ms = Massa do hidrogel seco

4.3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

As análises de FTIR-ATR foram descritas no item 4.3.1.5.

4.3.3.5 Ensaios Biológicos

Para avaliar a capacidade de células ligarem-se aos materiais analisados, células da linhagem VERO foram cultivadas diretamente sobre os hidrogéis já hidratados por 24 h na densidade de $5 \cdot 10^4$ células. Após, os hidrogéis foram fixados com paraformaldeído 4% por 15 minutos, lavados com tampão fosfato salino, e incubadas com DAPI, 4',6'-diamino-2-fenil-indol, ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 10 minutos. Dez campos aleatórios foram fotografados e contados em microscópio confocal.

Para verificar o potencial citotóxico dos materiais, foi realizado o protocolo de MTT conforme ISO 10993-5. Os hidrogéis hidratados foram expostos, na proporção de 3 cm^2 por mL, ao mesmo meio utilizado para o cultivo das células durante 6 e 12 h. Após as células da linhagem VERO foram expostas a esse meio condicionado por 24 hrs e após incubadas com MTT na concentração de 5 mg mL^{-1} por 2 h. A formação de formazan foi quantificada colorimetricamente através da absorbância medida a 570 nm.

Para avaliação do $\Delta\Psi\text{m}$, as células foram incubadas durante 30 min, a 37°C , com JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetil benzimidazolilcarbocianine iodeto, $2 \mu\text{g/mL}$). A fluorescência será $\Delta\Psi\text{m}$ medida através do comprimento de

excitação de 485nm e dos comprimentos de emissão de 540 e 590 nm. O $\Delta\Psi_m$ será calculado através de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) através da razão da leitura no comprimento de 590 nm (J-agregados vermelhos) e 540 nm (monômeros verdes).

Todos os ensaios biológicos foram realizados no Instituto do Cérebro (InsCer) da PUC-RS.

4.3.3.6 *Análise Estatística*

A ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey foi aplicado para a análise dos resultados de ensaios biológicos. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do software estatístico GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO

A extração do colágeno é realizada considerando principalmente aspectos de sua solubilidade, uma vez que sua estrutura é complexa e sua origem pode ser bastante variada.

Devido à natureza reticulada da proteína, o colágeno deve passar por um processo de pré-tratamento em solução salina ou alcalina diluída, dependendo da fonte de extração, para quebrar as reticulações e manter a cadeia polipeptídica intacta. À medida que o ácido/base penetra no subproduto, este incha duas a três vezes o tamanho original, ocorrendo a quebra das ligações não-covalentes da proteína^{37,40}.

O pré-tratamento alcalino é utilizado em casos de subprodutos mais rígidos, como ossos, que precisam de um tratamento mais agressivo, levando até dias nesta etapa. No entanto, o pré-tratamento com ácido diluído é mais recomendado para materiais mais frágeis, como peles. Apesar de suas diferenças, os dois métodos podem auxiliar na extração da proteína de uma mesma fonte⁴⁰. Neste trabalho, em testes preliminares, foram realizados pré-tratamentos considerando dois protocolos: 1) pré-tratamento em NaCl 1 mol L⁻¹ com posterior tratamento em HCl 0,5 mol L⁻¹ (El-Rashidy *et al.*⁴) e 2) solução alcalina de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (Sun *et al.*³⁹), mostrados na Figura 24.

Foi observado que, as peles tratadas em solução salina e posterior tratamento em ácido clorídrico não apresentaram, qualitativamente, um aumento expressivo de sua massa (Figura 24b e 24d) e uma amostra representativa apresentou aumento de apenas 25,9% sua massa original, indicando que não houve absorção/penetração das soluções no material. O oposto foi observado para as peles tratadas em solução alcalina. Para estas, sua massa aumentou aproximadamente 100% quando comparada a sua massa inicial (Figura 24c e 24d) e Tabela 5.

As peles tratadas de ambas as formas foram posteriormente extraídas em HAc 0,5 mol L⁻¹ durante 72 h. Ao fim da extração, a amostra 1 apresentou resíduos do material e um produto ácido levemente viscoso (ASC0, mostrado na tabela 6). Esta observação indica que o pré-tratamento da amostra foi insuficiente para romper a rede reticulada e, conseqüentemente, sua solubilidade não foi alterada de forma significativa. A amostra 2, oriunda do pré-tratamento com NaOH, apresentou menor quantidade de resíduo do material e um produto mais viscoso (ASC1) em comparação ao ASC0, indicando maior solubilidade do material ao longo da extração. Portanto, para experimentos subsequentes da presente investigação, foi utilizado pré-tratamento em solução alcalina diluída.

O pré-tratamento em solução alcalina é normalmente realizado para materiais que necessitam de tratamentos mais agressivos e/ou longos. Neste trabalho, foi observado que a utilização de solução alcalina diluída foi mais eficaz corroborando com o trabalho de Liu *et al.*³⁷, que mostraram que a solução de NaOH em concentrações entre 0,05 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ possibilitou um inchamento significativo no material.

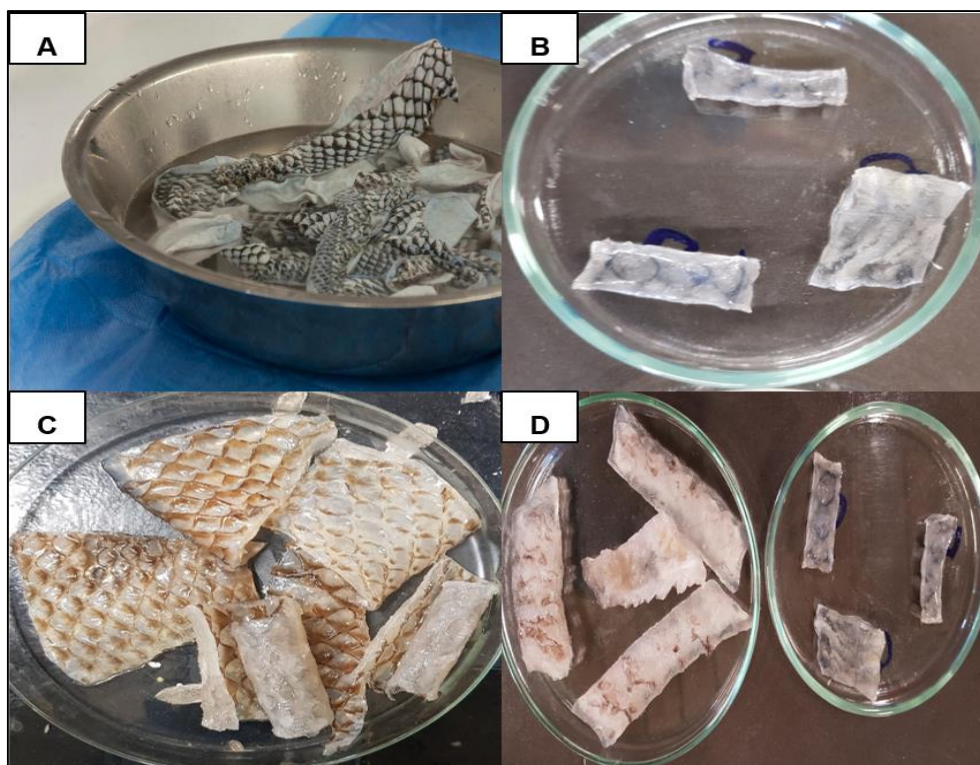


Figura 24: Pele de tilápia **(a)** antes do pré-tratamento, **(b)** após pré-tratamento em $\text{NaCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, **(c)** após pré-tratamento em $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e **(d)** comparativo do enchimento das peles tratadas em solução alcalina à esquerda e, solução salina e ácida à direita.

Tabela 5: Parâmetros observados após pré-tratamento das peles em solução alcalina de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, solução salina de $\text{NaCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ e posterior tratamento em solução de $\text{HCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Amostra teste	SPT*	m_i^{**} (g)	m_f^{**} (g)	GI*** (%)
1	NaCl	0,7575	0,9536	25,9
	HCl			
2	NaOH	0,4634	0,9173	97,95

*SPT = Solução de pré-tratamento; **m = Massa inicial e final; ***GI = grau de Intumescimento.

A tabela 6 mostra o código empregado para as amostras de colágeno, o sal utilizado para purificação por *salting-out*, volume de ASC e quantidade de colágeno extraído. Devido à quantidade de soluções ácidas oriundas da extração, apenas os colágenos utilizados na preparação dos hidrogéis (ASC4.3, ASC4.4 e ASC5.1) serão apresentados e discutidos.

A purificação da proteína por salting-out foi realizada em duas concentrações diferentes de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, à 2 mol L^{-1} e $0,9 \text{ mol L}^{-1}$, para avaliar qual resultaria em um colágeno(I) com maior grau de pureza. A amostra ASC0 apresentou maior quantidade de resíduos de pele ao fim da extração e a menor quantidade de colágeno extraído (29,6 mg). Já as amostras purificadas em menor concentração salina apresentaram textura esponjosa e menos rígidas.

Tabela 6: Parâmetros de purificação das soluções ácidas e caracterizações realizadas.

Amostra	Salting-out	V_{ASC} (mL)	Quantidade extraída (mg)
ASC0	NaCl 2 mol L^{-1}	50	29,6
ASC1.1	NaCl 2 mol L^{-1}	50	32,1
ASC1.2	NaCl 2 mol L^{-1}	50	62,6
ASC2.1	NaCl 2 mol L^{-1}	20	99
ASC2.2	NaCl 2 mol L^{-1}	20	102
ASC3.1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mol L^{-1}	25	20,5
ASC3.2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mol L^{-1}	25	68,0
ASC3.3	NaCl $0,9 \text{ mol L}^{-1}$	31	86,0
ASC4.1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mol L^{-1}	30	25,0
ASC4.2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mol L^{-1}	30	75,2
ASC4.3	NaCl $0,9 \text{ mol L}^{-1}$	30	82,5
ASC4.4	NaCl $0,9 \text{ mol L}^{-1}$	32	150,0
ASC5.1	NaCl $0,9 \text{ mol L}^{-1}$	72,5	245,0
ASC5.2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	130	260,0

	0,9 mol L ⁻¹		
ASC6	(NH ₄) ₂ SO ₄	60	230,0
	0,9 mol L ⁻¹		

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 25 mostra a aparência do colágeno purificado e liofilizado das amostras ASC4.3 (Figura 25a) e ASC5.1 (Figura 25b). A Figura 26 mostra a fotomicrografia de MEV dos colágenos purificados das amostras ASC4.3 (Figura 26a, 26d e 26g), ASC4.4 (Figura 26b, 26e e 26h) e ASC5.1 (Figura 26c, 26f e 26i), os quais foram utilizadas na preparação dos hidrogéis.

Após a liofilização do colágeno, o mesmo adquire uma textura esponjosa característica do colágeno(I) (Figura 25a e 25b). Algumas áreas parecem mais rígidas e rugosas, o que pode ser característico de proteínas colagenosas e/ou decorrente do processo de liofilização^{153,154}.

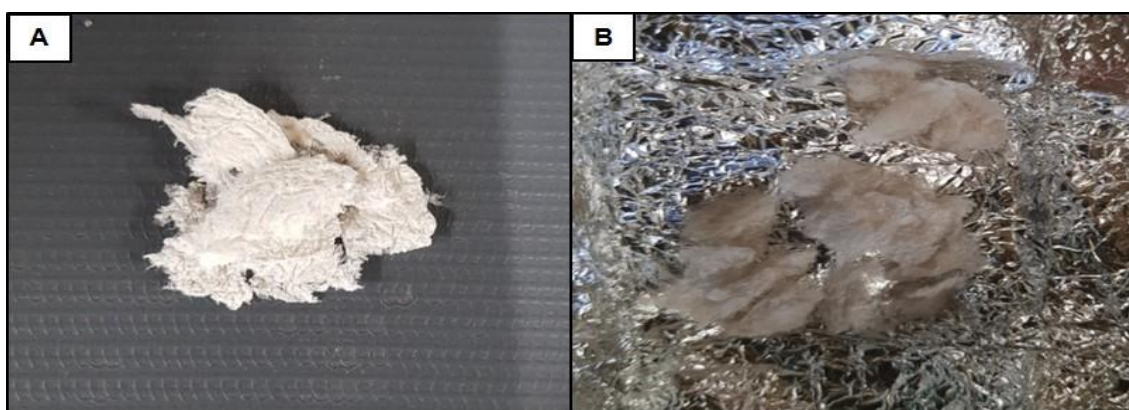


Figura 25: Imagem do colágeno seco das amostras **(a)** ASC4.3 e **(b)** ASC5.1.

Também foram observadas algumas cavidades, mais predominantes na amostra ASC4.3 (Figura 26a) e estruturas fibrosas (Figura 26d, 26e e 26f), o que pode favorecer sua aplicação como biomaterial¹⁵⁵.

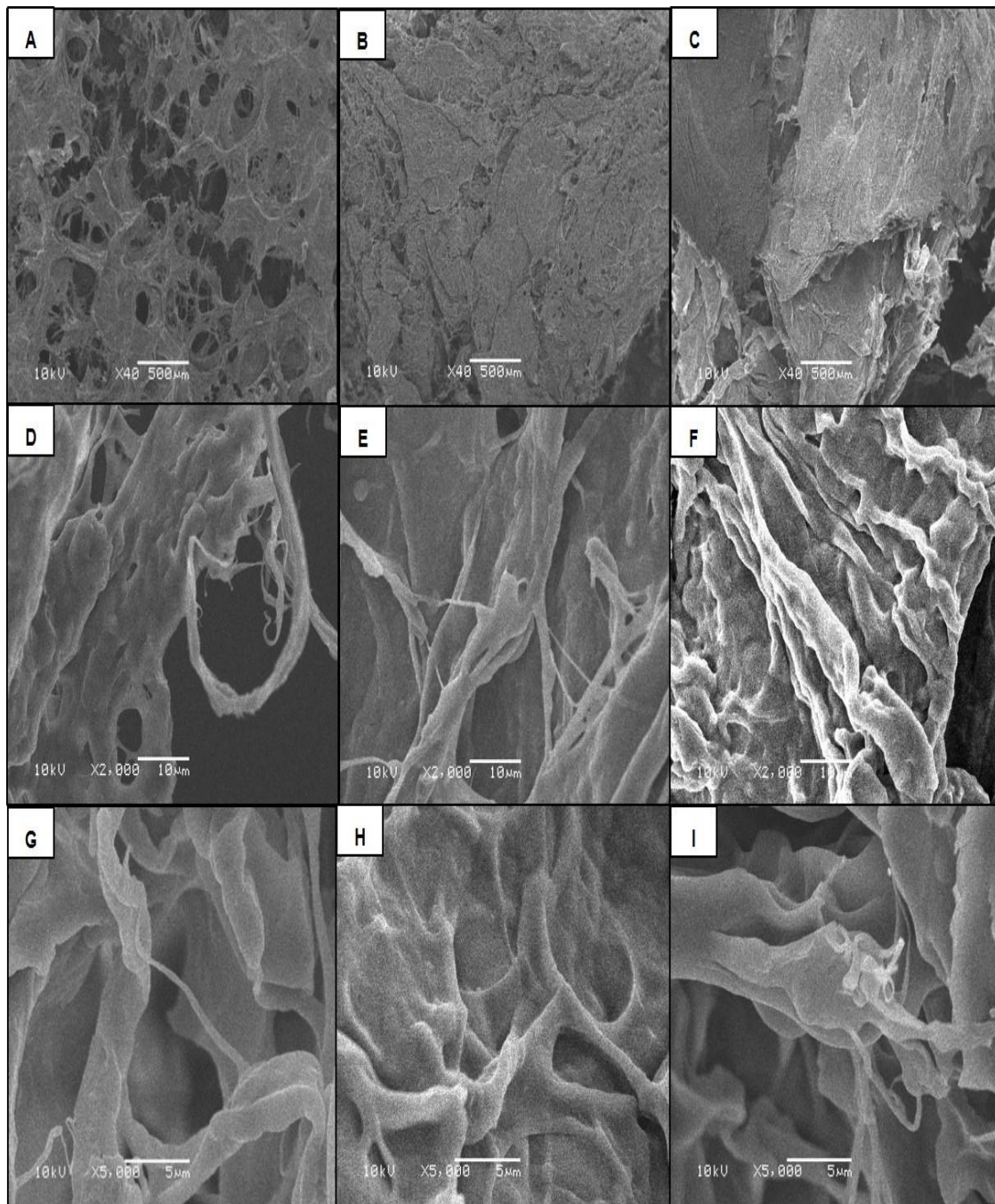


Figura 26: Fotomicrografia de MEV para amostras de colágeno purificados de ASC4.3, ASC4.4 e ASC5.1 (a, b, c) à magnificação 40x, (d, e, f) 2000x e (g, h, i) 5000x.

5.1.2 Eletroforese (SDS-PAGE)

As Figuras 27 e 28 mostram o SDS-PAGE das amostras de colágeno das amostras de colágeno apresentados na tabela 6.

A eletroforese foi utilizada para determinar a composição das subunidades de colágeno. Observa-se que todas as amostras de colágeno apresentaram pelos menos duas cadeias α distintas (α_1 e α_2) e dímero β , características de colágeno(I). Observou-se ainda a presença de fragmentos de cadeias γ (trímero) em algumas amostras de colágeno, mais presentes nas amostras ASC1.1 e ASC1.2, bem como a presença de outros fragmentos de cadeias, característicos de outros tipos de colágeno.

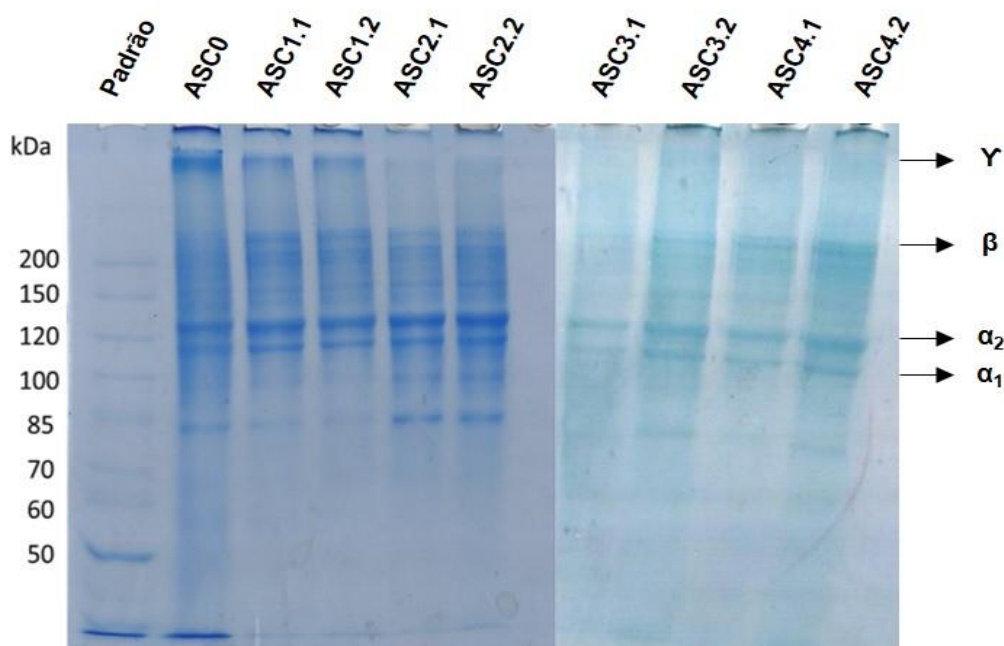


Figura 27: Eletroforese de amostras de colágeno purificadas à concentração de 2 mol L^{-1} de **(ASC0 à ASC2.2)** cloreto de sódio e **(ASC3.1 à ASC4.2)** sulfato de amônio.

O perfil das amostras apresentado através da técnica de eletroforese demonstra o efeito do processo de purificação por *salting-out*, quando realizado em concentrações salinas elevadas. De maneira geral, todas as amostras apresentaram duas cadeias α , associados aos pesos moleculares de 110 kDa e 120 kDa, e uma cadeia β referente ao peso molecular de aproximadamente 220 kDa. Tais fragmentos sugerem que o colágeno extraído da pele de tilápia é

majoritariamente colágeno(I). No entanto, observa-se também a presença de outros fragmentos de cadeias, os quais foram precipitados durante a purificação da proteína. Em aproximadamente 85 kDa observa-se em alguns amostras, um sinal de colágeno(III) e sinais situados entre cadeias α e β , que podem estar associados ao colágeno(V)^{39,156}.

Em menores concentrações salinas observa-se apenas presença de fragmentos de α_1 e α_2 e dímero β (Figura 28), portanto, houve apenas precipitação de colágeno(I). Para as amostras purificadas com sulfato de amônio, os sinais dos fragmentos são mais fracos e, mostram que não houve precipitação completa dos fragmentos de cadeia de colágeno, diferentemente das amostras purificadas com NaCl. Não é possível observar a presença de cadeias γ nas amostras apresentadas na Figura 28, indicando baixo teor de reticulações intra e intermoleculares, podendo-se afirmar o mesmo para as amostras ASC4.3, ASC4.4 e ASC5.1 que apresentaram sinais fracos ou não apresentaram cadeias β ¹⁵⁷.

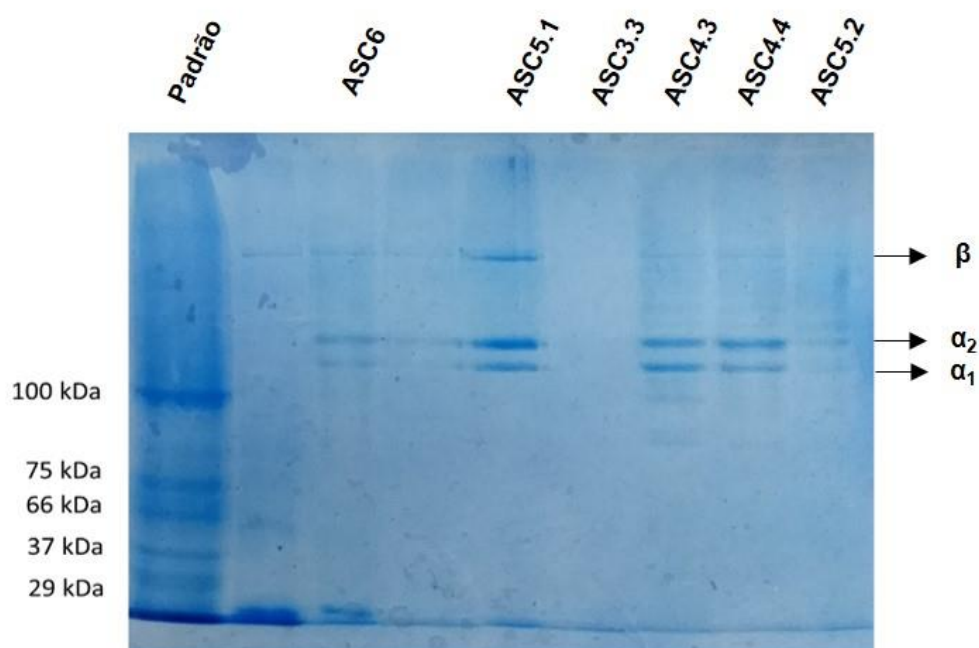


Figura 28: Eletroforese de amostras de colágeno purificadas com 0,9 mol L⁻¹ de cloreto de sódio e sulfato de amônio.

Com base nestes resultados e devido à presença de apenas um tipo de colágeno nas amostras ASC4.3, ASC4.4 e ASC5.1, estas foram as amostras escolhidas para a preparação dos hidrogéis.

5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC é empregada principalmente para determinar a temperatura de desnaturação do colágeno. Estudos mostram que a desnaturação do colágeno extraído de animais aquáticos pode variar entre 20 °C e 40 °C¹⁵⁸. O colágeno da pele de tilápia, por exemplo, possui sua temperatura de desnaturação entre 32 °C a 36 °C. Essa variação se deve pelo método de extração e purificação, que pode alterar as cargas dos aminoácidos presentes e, portanto, alterar suas propriedades físico-químicas^{4,39,40}.

Nesta investigação, o termograma de DSC apresentado na Figura 29, mostra que o colágeno extraído, purificado e solubilizado em HAc 50 mM não apresenta transições terminais na faixa de temperatura em de 0 °C à 40 °C. Conforme a literatura, nesta faixa de temperatura, possivelmente ocorreria a desnaturação do colágeno, o que seria observado através de uma possível transição entre 32 °C e 36 °C. No entanto, a ausência de transições térmicas indica que o colágeno provavelmente sofreu desnaturação ao longo do processo de extração. Isto pode ter ocorrido, por exemplo, em função da agitação acelerada durante a etapa de extração ácida e posterior purificação à temperatura ambiente.

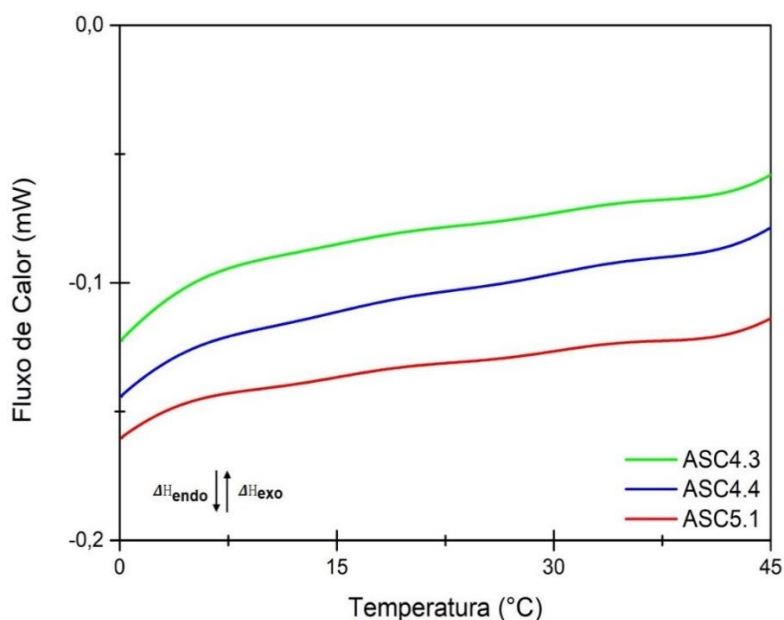
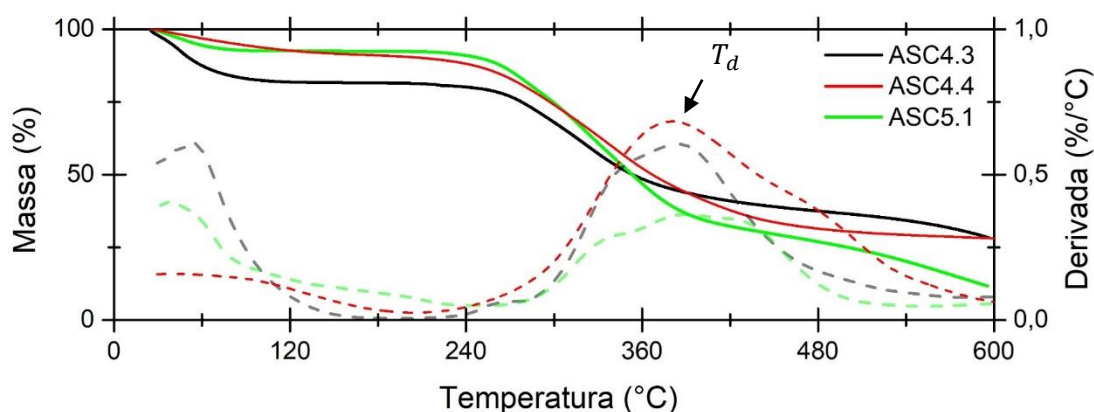


Figura 29: Termograma de DSC de uma amostra de colágeno liofilizada e posteriormente solubilizada em HAc 50 mM, seguida pela estabilização à 10 °C por 48 h.

5.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é empregada principalmente para determinação da temperatura máxima de degradação do colágeno, possibilitando identificar, também, a presença de resíduos de outras proteínas e quantidade de água adsorvida nas amostras, o que pode fornecer informação sobre o arranjo estrutural do colágeno. A Figura 30 mostra o termograma de três amostras de colágeno liofilizadas.



A amostra ASC4.3 apresenta a maior perda de água, equivalente à 18,4%. Já as amostras ASC4.4 e ASC5.1 apresentaram uma perda de massa até aproximadamente 170 °C com frações equivalentes à 8,8% e 6,9%, respectivamente. Esse resultado sugere uma quantidade maior de água livre na primeira amostra e maior quantidade de água ligada nas últimas. A maior quantidade de água ligada nas amostras ASC4.4 e ASC5.1 pode ser um indicativo da presença de estrutura terciária, visto que as ligações de hidrogênio provenientes da água contribuem para a estabilidade da hélice tripla do colágeno¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

A segunda etapa representa a maior variação de massa das amostras visto que é a etapa de degradação das cadeias de aminoácido. Nesta etapa observa-se que a amostra ASC5.1 apresenta maior variação, equivalente a 63,2% de massa, e temperatura de degradação máxima à 329,6 °C, levemente superior a alguns resultados apresentados na literatura para o colágeno(I)^{159,160}. Esta diferença de perda de massa ao se comparar com as amostras ASC4.3 (44,5%) ASC4.4 (62,7%) foi possivelmente ocasionada pela ausência de fragmentos de cadeia β , o que pode ter ocasionado uma leve diminuição na

temperatura de degradação máxima no colágeno, equivalente à 317,5 °C e 317,04 °C, respectivamente ¹⁶².

5.1.5 Infravermelho (FTIR-ATR)

A Figura 31 mostra a análise de infravermelho realizado das amostras de colágeno liofilizadas. A tabela 7 mostra a região de bandas características do colágeno.

A região de estiramento da amida A se encontra em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento N-H. Estudos prévios mostram que o sinal de estiramento N-H ocorre na região de $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$, entretanto, quando o mesmo grupo NH de um peptídeo está envolvido em uma ligação de hidrogênio há uma mudança no sinal, sendo possível observá-lo em $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ ^{4,11}. As bandas das amostras ASC4.3 (3280 cm^{-1}) e ASC4.4 (3295 cm^{-1}) são observadas em frequências ligeiramente menores que e ASC5.1 (3310 cm^{-1}), sugerindo mais ligações de hidrogênio do grupo NH nas primeiras amostras citadas³⁶.

Os sinais da amida B são encontrados em $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ e associados ao estiramento assimétrico do grupo $-\text{CH}_2$. É possível identificar os sinais da amida B nas amostra ASC4.4 (2920 cm^{-1}) ASC5.1 (2925 cm^{-1}), e sinais menos expressivos na amostra ASC4.3 (2921 cm^{-1})³⁶.

Os sinais das amidas I representam o estiramento de grupos carbonila ao longo da cadeia da proteína. A amostra ASC5.1 (1650 cm^{-1}) apresentou sinal em frequências maiores que as demais amostras, em 1630 cm^{-1} . A mudança do sinal de amida I para frequências mais baixas indica maior presença de ligações de hidrogênio, o que resulta em um menor grau de ordem molecular^{11,36,163}.

Os sinais de amida II e III estão relacionados a torção NH acoplados a estiramento CN em 1550 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , respectivamente. Maior frequência de sinal de amida II apresentado na amostra ASC5.1 (1550 cm^{-1}) pode ser resultado de maior hidratação da cadeia principal da proteína^{36,39}, concordando com o perfil de perda de água apresentado pelo TGA da amostra. Todas as amostras apresentam sinais de amida III em 1235 cm^{-1} .

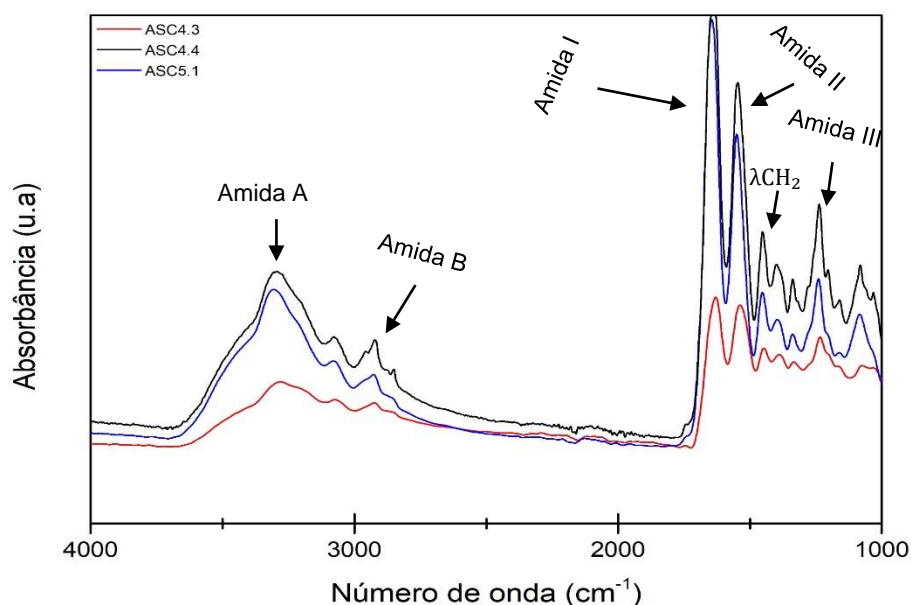


Figura 31: Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) das amostras de colágeno liofilizados.

O método também permite determinar se há presença da hélice tripla caso a razão de absorção entre a amida III e sinal de torção CH_2 em 1450 cm^{-1} se aproxima de 1. A amostra ASC5.1 apresentou a razão de absorção mais próxima do valor unitário, com razão de 0,94. Portanto, pode-se afirmar que a hélice tripla se manteve nesta amostra^{39,155,164}.

Tabela 7: Atribuição dos sinais do espectro de infravermelho do colágeno extraído da pele de tilápia.

Região	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
Amida A	3400	Estiramento N-H acoplado à ligações de hidrogênio
Amida B	2930	Estiramento assimétrico da ligação C-H dos grupos CH_2
Amida I	1650	Estiramento C=O e ligação de hidrogênio acoplado ao -COOH
Amida II	1550	Torção NH acoplado ao estiramento CN
-	1450	Torção CH_2
-	1400	Estiramento simétrico da ligação C=O do grupo -COOH

-	1338	Balanço CH ₂
Amida III	1240	Torção NH acoplado ao estiramento CN

5.2 FUNCIONALIZAÇÃO DO PEG

O polietilenoglicol foi funcionalizado com anidrido metacrílico para a obtenção de grupos reticuláveis nas extremidades da cadeia polimérica (Figura 32). Assim, a formação do hidrogel se dá pela reação entre os grupos reticuláveis inseridos.

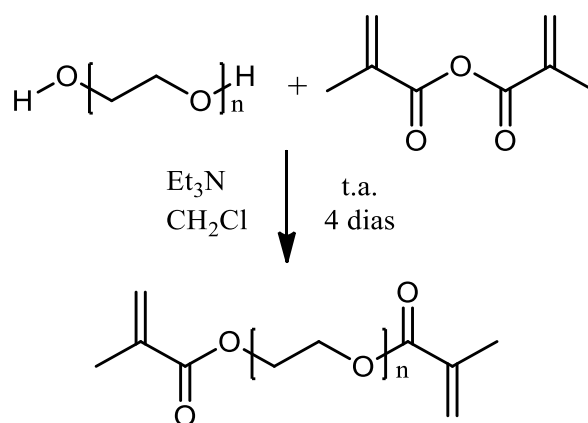


Figura 32: Reação de funcionalização do PEG com anidrido metacrílico.

A reação de funcionalização pode ser comprovada pela análise de RMN de ^1H , mostrado na Figura 33. Os hidrogênios ligados ao carbono vinílico do grupo metacrilato aparecem como singletos em 5,6 e 6,2 ppm. Para determinar a eficiência da funcionalização, as integrais dos hidrogênios da ligação dupla do metacrilato das extremidades da cadeia foram comparadas à integral do sinal em 4,3 ppm, referente aos hidrogênios dos dois $-\text{CH}_2$ terminais do PEG, resultando em uma razão de 0,915, significando que houve funcionalização próximo de 100% da cadeia polimérica.

Este resultado pode ser comprovado determinando o grau de polimerização do PEG-MA, utilizando a razão entre a integral do sinal em 3,7 ppm, referente aos hidrogênios do $-\text{CH}_2$ da unidade repetitiva do PEG, com a integral dos sinais dos hidrogênios das ligações duplas, resultando em um grau de polimerização de 455,75, de acordo com as equações 4 e 5, respectivamente, indicando o número de unidades repetitivas. Portanto, os valores obtidos comprovam a eficiência e funcionalização do PEG¹⁵¹.

$$\frac{I_{H1} + I_{H2}}{I_{4,3ppm}} = \frac{4,09}{4,47} = 0,915 \quad (4)$$

$$\frac{I_{3,7ppm}}{I_{Hdupla}} = \frac{1864}{4,09} = 455,75 \quad (5)$$

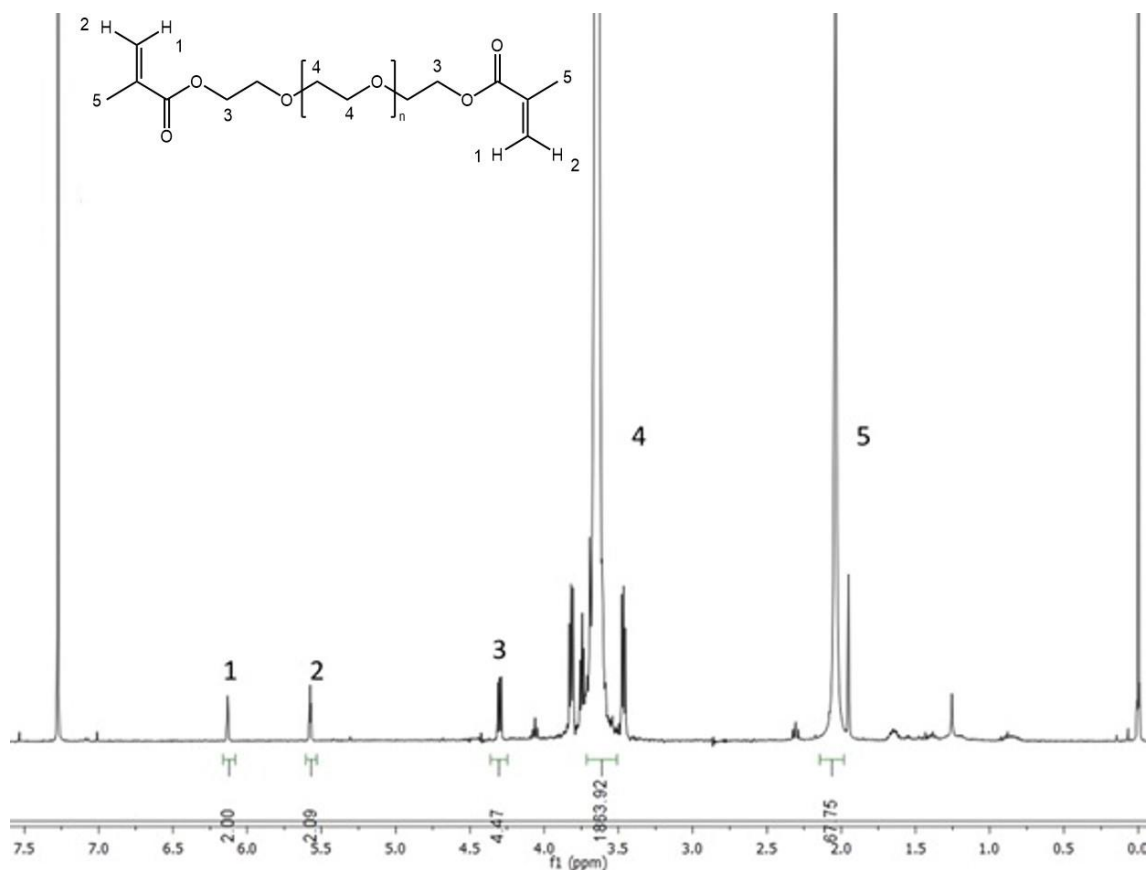


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H do PEG-MA em CDCl_3 .

5.3 CARACTERIZAÇÕES DOS HIDROGÉIS

Tendo em vista as caracterizações realizadas do colágeno extraído das amostras ASC4.3, ASC4.4 e ASC5.1, mostrando a presença predominante do colágeno(I), optou-se por utilizar tais amostras na preparação dos hidrogéis. As quantidades de polímero utilizados nos sistemas de hidrogéis são descritos no tópico 4.2.4, tabela 4, página 65.

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A atividade biológica de um hidrogel pode variar conforme seus parâmetros morfológicos como, por exemplo, a porosidade do material. De modo geral, um suporte utilizado para engenharia de tecidos deve apresentar tamanho de poros entre 100 μm e 200 μm , sendo fatores que controlam a morfologia do

suporte o concentração e pH da dispersão de polímero, taxa de congelamento, liofilização, entre outros¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

A Figura 34 mostra as fotomicrografias para os sistemas de hidrogéis: PEG/Q (Figura 34a e 34b) e PEG/Q-2C-10I (Figura 34c e 34d), PEG/Q-6C-10I (Figura 34e e 34f), PEG/Q-2C-15I (Figura 34g e 34h) e PEG/Q-6C-15I (Figura 34i e 34j).

O hidrogel composto por PEG/Q (Figura 34a e 34b) apresenta alguns poros de tamanhos irregulares, bem como a presença de estruturas esféricas, possivelmente partículas de quitosana que foram agregadas e/ou não-solubilizadas na preparação da solução de PEG-Q¹⁶⁸.

As fotomicrografias dos hidrogéis PEG/Q-2C-10I (Figura 34c e 34d) e PEG/Q-2C-15I (Figura 34g e 34h) mostram a presença de estruturas fibrosas, devido à presença de colágeno na composição dos hidrogéis. No entanto, os hidrogéis PEG/Q-6C-10I (Figura 34e e 34f) e PEG/Q-6C-15I (Figura 34i e 34j) não apresentam as mesmas estruturas fibrosas mesmo contendo colágeno em suas composições.

Este efeito pode ter sido causado pelo processo de secagem, visto que as amostras PEG/Q-2C-10I e PEG/Q-2C-15I foram submetidas à uma liofilização mais lenta, conservando a estrutura fibrosa do colágeno e, assim, evitando com que os poros da superfície colapsassem¹⁶⁹. A presença de quitosana no hidrogel também pode influenciar no aparecimento de uma superfície menos porosa, visto que é um polímero com fortes tendências a formar membranas, sendo possível observar esta tendência em todas as amostras de hidrogel¹⁶⁵.

Apesar dos hidrogéis PEG/Q-6C-10I e PEG/Q-6C-15I não apresentarem porosidade em suas superfícies, é muito provável a presença de poros internos em suas estruturas. No entanto, vale ressaltar que não foi avaliada a estrutura interna dos hidrogéis neste trabalho.

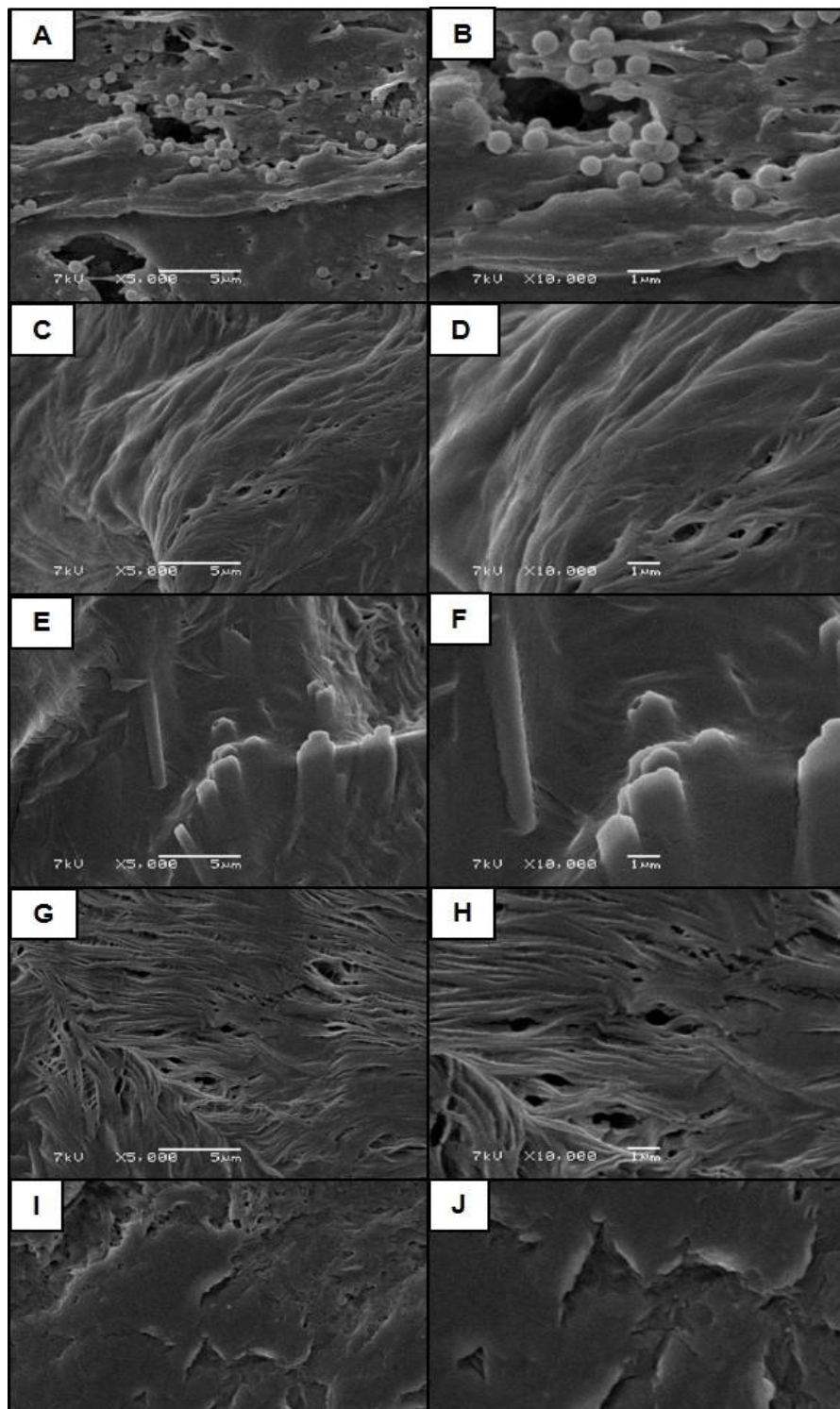


Figura 34: Fotomicrografia de MEV para os sistemas de hidrogéis **(a,b)** PEG/Q, **(c,d)** PEG/Q-2C-10I, **(e,f)** PEG/Q-6C-10I, **(g,h)** PEG/Q-2C-15I e **(i,j)** PEG/Q-6C-15I.

5.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 35 mostra os termogramas de TGA para amostras de hidrogéis preparados com 10 mmol (Figura 35a) e 15 mmol (Figura 35b) do sistema de iniciadores.

É possível identificar que a perda de massa acontece em duas etapas para os hidrogéis preparados apenas com PEG-MA e quitosana, e em três etapas para os hidrogéis contendo colágeno, mostrados nas Figuras 35a e 35b.

A primeira etapa ocorre na faixa de aproximadamente 70 °C à 170 °C, mostra a perda de água. Para os hidrogéis contendo colágeno em sua composição, é possível observar pelo termograma que a segunda etapa de degradação se inicia em aproximadamente 220 °C e vai até 360 °C, com temperatura máxima de degradação em 324 °C graus. Esta faixa de degradação corrobora com a faixa de degradação das cadeias da proteína do colágeno¹⁵⁹.

Estudos mostram que a faixa de degradação da quitosana encontra-se entre 179 °C à 862 °C, com temperatura máxima de degradação em torno de 550 °C. Já o PEG-MA possui sua temperatura máxima de degradação, em aproximadamente 410 °C. Ou seja, neste trabalho, foi possível observar que a maior perda de massa (entre 490 °C-520 °C) ocorreu na faixa de temperatura dos principais componentes empregados nos hidrogéis^{170,171}.

É possível observar que a temperatura máxima de degradação sofre um leve deslocamento com a concentração de iniciadores, visto que os hidrogéis preparados com 10 mmol do sistema de iniciadores possuem uma temperatura máxima de degradação em 492 °C, enquanto hidrogéis preparados com 15 mmol apresentaram temperatura máxima de degradação em 515 °C, não ocorrendo mudanças com a adição do colágeno no sistema visto que o mesmo é degradado na segunda etapa de perda de massa, indicando também que a reticulação é majoritariamente entre o PEG-MA e quitosana.

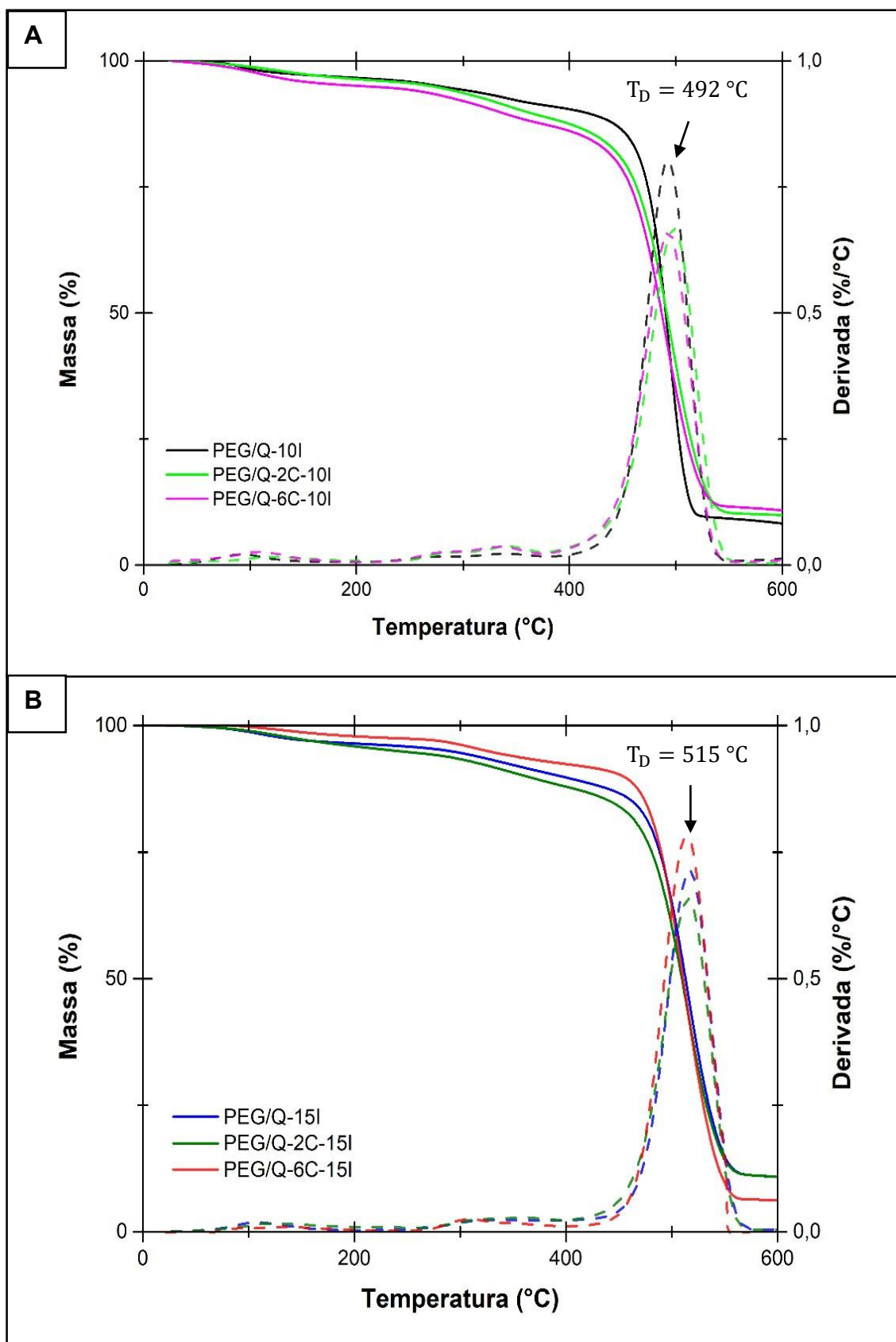


Figura 35: Termograma de TGA de amostras de hidrogéis preparados com **(a)** 10 mmol e **(b)** 15 mmol do sistema de iniciadores.

5.3.3 Grau de Intumescimento (GI)

A Figura 36 mostra o grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis. Os valores de grau de intumescimento em 20 h são mostrados na tabela 9 (apêndice).

Alguns testes foram feitos utilizando o sistema de iniciadores bissulfito de sódio (BSS) e PSP onde foi observado a precipitação de quitosana na solução para a preparação dos hidrogéis. Portanto, foi utilizado o sistema TEMED e PSP, mesmo observando-se também a precipitação de proteína ao ser adicionado o sistema de iniciadores em todas as amostras contendo colágeno, mas visualmente menos do que no sistema usando bissulfito de sódio.

Os valores do grau de intumescimento variam de acordo com a quantidade de iniciador e colágeno. Os hidrogéis contendo 10 mmol de iniciadores (Figura 36a) apresentam valores menores de intumescimento para os hidrogéis PEG/Q-2C e PEG/Q-6C. A diminuição do grau de intumescimento ao elevar a quantidade de colágeno mostra-se de acordo com o esperado, visto que há um aumento na quantidade de polímero na rede do hidrogel em um mesmo volume, contribuindo para menor absorção de água e, conseqüentemente, menores valores no grau de intumescimento^{120,121}.

Observa-se, também, que não há uma variação expressiva no grau de intumescimento após 20 h para os hidrogéis PEG/Q-2C-10I e PEG/Q-6C-10I, que pode ter sido causado pela presença de precipitados no meio, que podem ter terminado o processo de reticulação antecipadamente. A presença de precipitado pode, também, influenciar na propagação dos iniciadores no meio, limitando a reação de reticulação^{120,121}.

Observa-se, na Figura 36b, uma cinética de absorção melhor definida, com uma diminuição no grau de intumescimento com o aumento da quantidade de colágeno. O padrão bem definido de intumescimento pode ser relacionado com o aumento da concentração de iniciadores, pois a maior concentração de radicais proporciona uma melhora na propagação da reação de reticulação. Além disso, a presença de precipitados terão uma menor influência na inibição da reação^{120,121}.

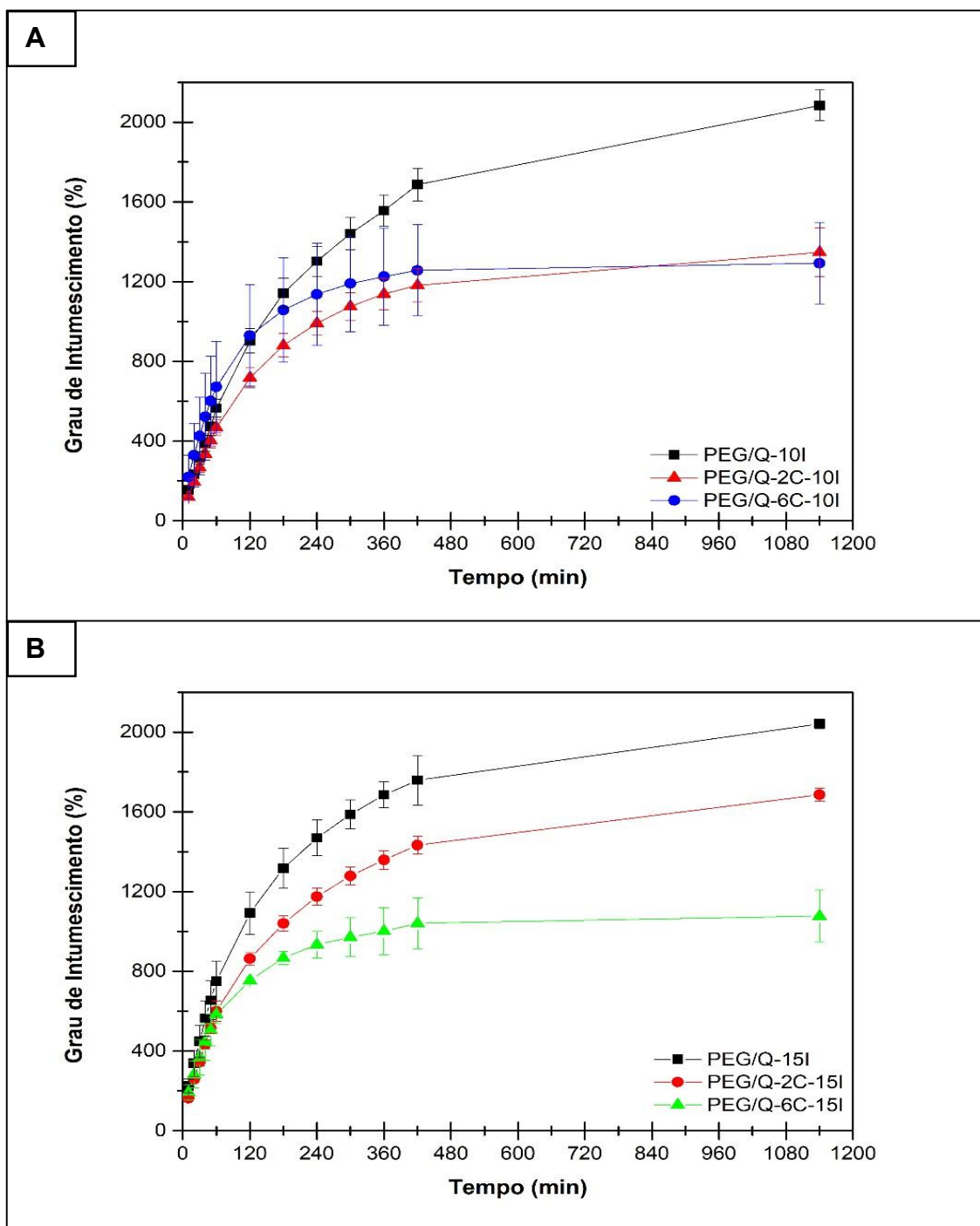


Figura 36: Grau de intumescimento em função do tempo das sistemas de hidrogéis contendo PEG/Q e PEG/Q-C utilizando (a) 10 mmol e (b) 15 mmol do sistema de iniciadores TEMED e PSP.

Pelo perfil de absorção de água é possível afirmar que, mesmo não apresentando porosidade superficial pelas fotomicrografias de MEV nas amostras PEG/Q-6C-10I e PEG/Q-6C-15I, os mesmos apresentavam poros internos à estrutura.

5.3.4 Infravermelho (FTIR-ATR)

A análise de infravermelho foi realizada em nos sistemas de hidrogéis é mostrada na Figura 37. A atribuição dos sinais dos espectros é mostrada na tabela 8.

A partir do espectro é possível identificar sinais característicos da amida A (3400 cm^{-1}) em todos os sistemas, visto que é um sinal comum dos componentes do hidrogel (PEG/Q-C). No entanto, observa-se um sinal mais intenso para os hidrogéis contendo 6 mg de colágeno, que pode ser associado à maior quantidade da proteína em sua composição.

São observados sinais em 2940 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento simétrico e assimétrico de grupos CH_2 , associados ao PEG e amida B característica de polissacarídeos e colágenos^{36,172,173}.

Sinais de amida I, II e III também são observados em 1645 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} . Tais sinais são característicos de resíduos de grupos N-acetil, proveniente da quitosana, portanto, sendo comum aos espectros. No entanto, são observados sinais progressivamente mais intensos em hidrogéis contendo colágeno em sua composição, mostrando também a presença das amidas da proteína¹⁷².

Tabela 8: Atribuição dos sinais dos espectros de infravermelho dos sistemas de hidrogéis.

Região	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
Amida A	3400	Estiramento N-H acoplado ligações de hidrogênio
-	2940	Estiramento simétrico de CH_2
Amida B	2870	Estiramento assimétrico da ligação C-H dos grupos CH_2
Amida I	1645	Estiramento C=O e ligação de hidrogênio acoplado ao -COOH
Amida II	1550	Torção NH acoplado ao estiramento CN
-	1450	Torção CH_2
-	1400	Estiramento simétrico da ligação C=O do grupo -COOH
-	1340	Balanço CH_2
-	1280	Balanço OH

Amida III	1240	Torção NH acoplado ao estiramento CN
-	1143	Estiramento assimétrico de pontes C-O-C
-	1095	Estiramento C-O
-	1060	Estiramento C-O

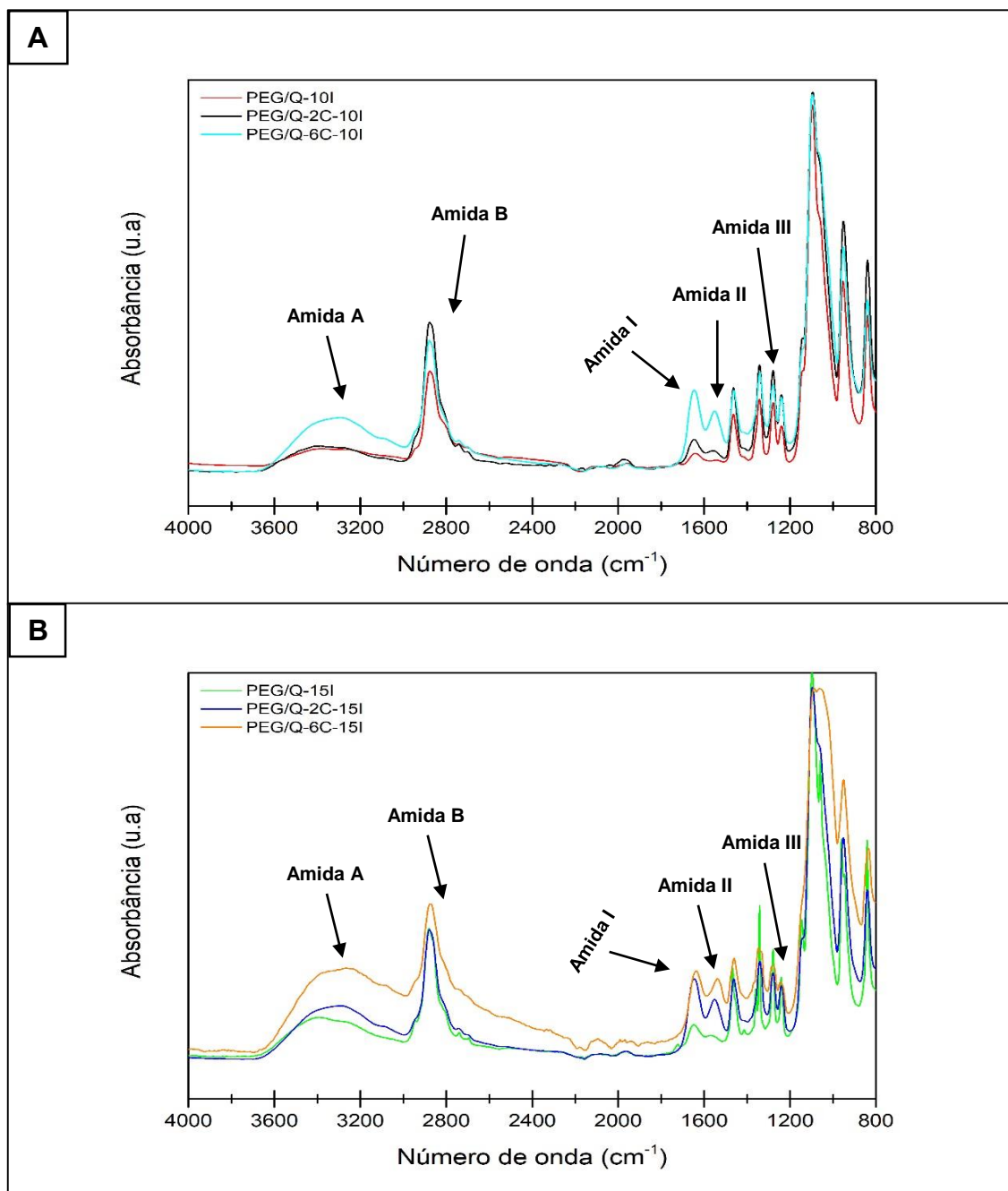


Figura 37: Espectro de infravermelho de hidrogéis contendo PEG, quitosana, colágeno e utilizando (a) 10 mmol e (b) 15 mmol dos iniciadores TEMED e PSP

5.3.5 Ensaios Biológicos

Para melhor avaliar a viabilidade dos hidrogéis para medicina regenerativa é necessário considerar o comportamento dos mesmos à adesão celular em sua superfície. Portanto, as células foram cultivadas diretamente sobre os materiais e quantificadas através da contagem de núcleos após a incubação com o intercalante DAPI, mostrado na Figura 38. Os sistemas foram comparados com o controle de células cultivadas em placas de cultura comerciais tratadas para a adesão celular. Controle e os hidrogéis receberam o mesmo número inicial de células e foram avaliados após 6 e 12 h.

Em 6h, o grupo PEG/Q-2C-15I demonstra maior diferença estatística em relação ao controle e aos hidrogéis PEG/Q-10I e PEG/Q-2C-10I, mostrando maior eficiência em permitir a adesão celular. Observa-se que o grupo PEG/Q-6C-15I apresenta diferença estatística significativa frente aos demais grupos, mostrando-se o grupo experimental mais apto à adesão celular no dado tempo.

No tempo de 12h, os hidrogéis PEG/Q-10I, PEG/Q-2C-10I e PEG/Q-2C-15I apresentaram significativamente menos células aderidas frente ao controle, enquanto o PEG/Q-15I apresentou mais células aderidas. Todos os hidrogéis foram significativos em relação ao PEG/Q-10I e PEG/Q-15I; os hidrogéis PEG/Q-6C-10I e PEG/Q-6C-15I demonstraram relevância estatística com mais células do que PEG/Q-2C-10I, enquanto PEG/Q-6C-15I também foi mais significativa do que PEG/Q-6C-10I.

Analisando o desempenho ao longo do tempo de análise, os sistemas controle e PEG/Q-15I mostram um aumento significativo no número de células aderidas, diferente dos sistemas PEG/Q-10I, PEG/Q-2C-15I e PEG/Q-6C-15I, onde houve uma diminuição no número de células aderidas, efeito que pode ter sido causado por tamanho incompatível dos poros dos hidrogéis¹⁷⁴.

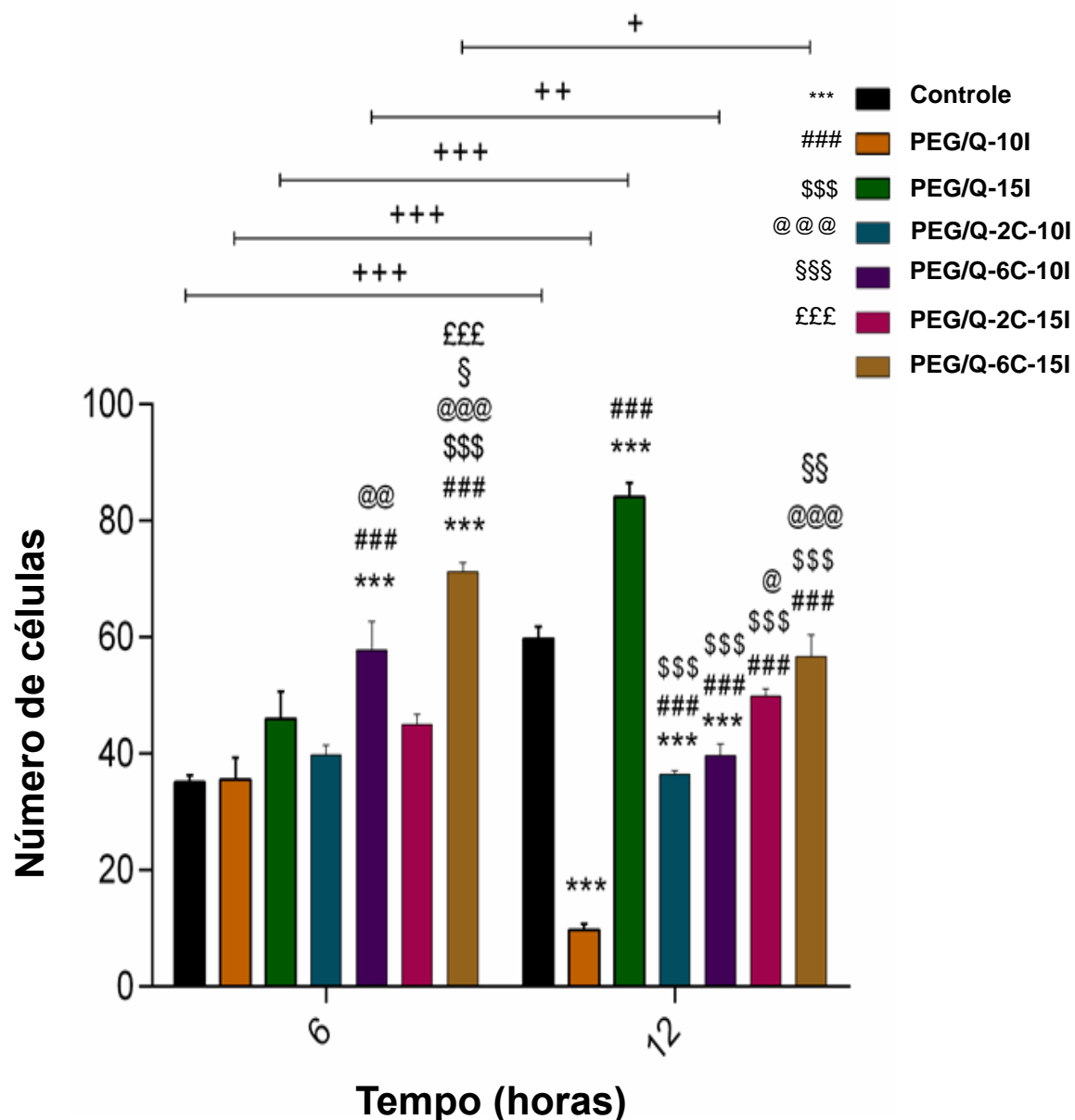


Figura 38: Adesão celular dos sistemas de hidrogéis em uma linhagem de células VERO em 6 h e 12 h.

A viabilidade das células foi inferida através dos ensaios de MTT (Figura 39), ao passo que para avaliar a homeostase energética, o potencial de membrana mitocondrial foi mensurado através da técnica do JC-1 (Figura 40). As células foram expostas ao meio condicionado, de acordo com a ISSO 10993, e comparadas com células não expostas ao meio condicionado pelos hidrogéis, mas cultivadas nas mesmas condições experimentais, para determinar o potencial de citotoxicidade.

Relacionando a viabilidade celular, a qual foi medida através da redução do MTT a formazan, observou-se que todos os sistemas apresentaram tendência de diminuição do metabolismo mitocondrial em relação ao controle, não havendo relevância estatística e, comparando-se entre os grupos experimentais, os materiais não demonstraram potencial citotóxico.

Quanto ao potencial da membrana mitocondrial, observa-se que em 6 h de análise, os hidrogéis PEG/Q-10I e PEG/Q-15I demonstraram perda na eficiência da cadeia respiratória, quando comparados ao controle, porém o efeito não se manteve após 12 h de exposição.

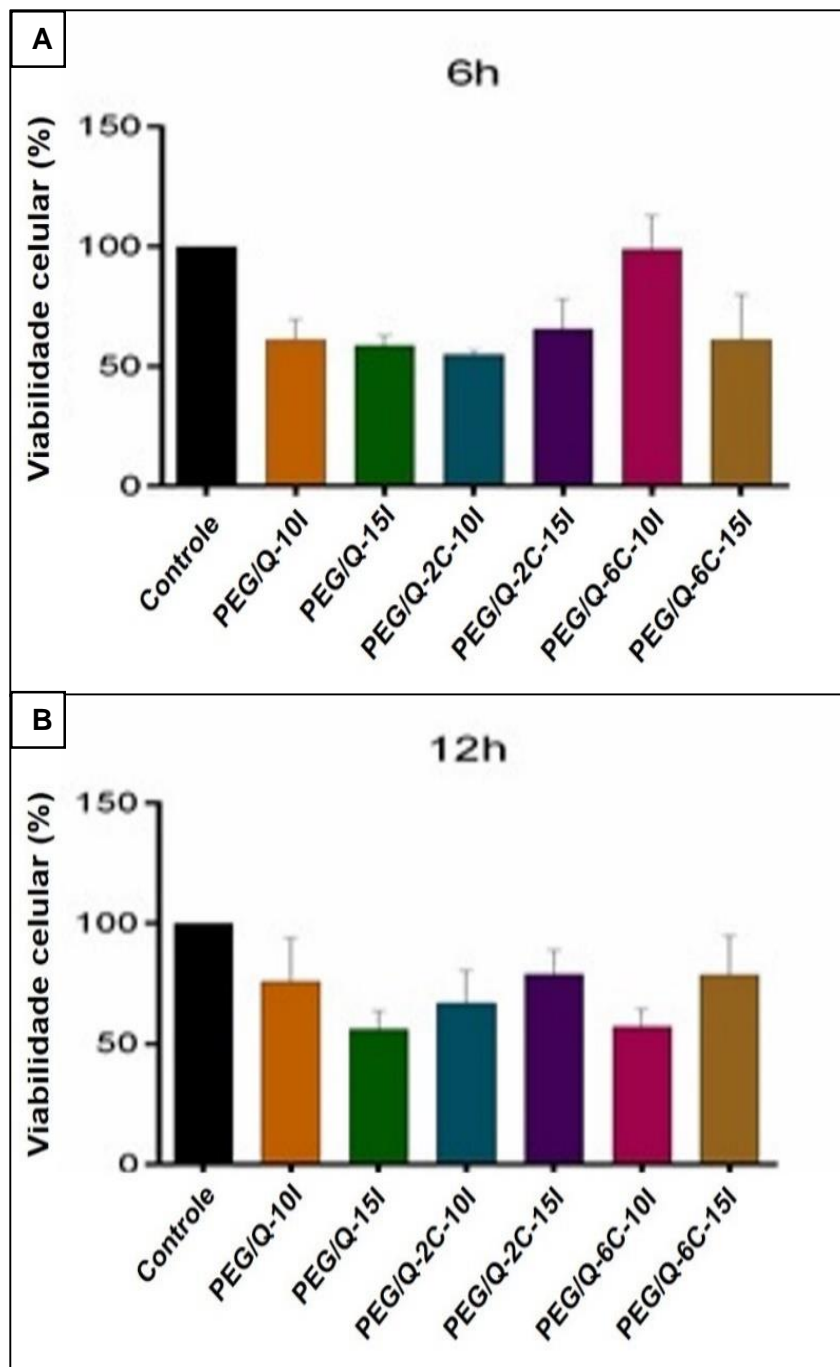


Figura 39: Viabilidade celular por MTT dos hidrogéis em linhagem de células VERO em (a) 6 h, (b) 12 h.

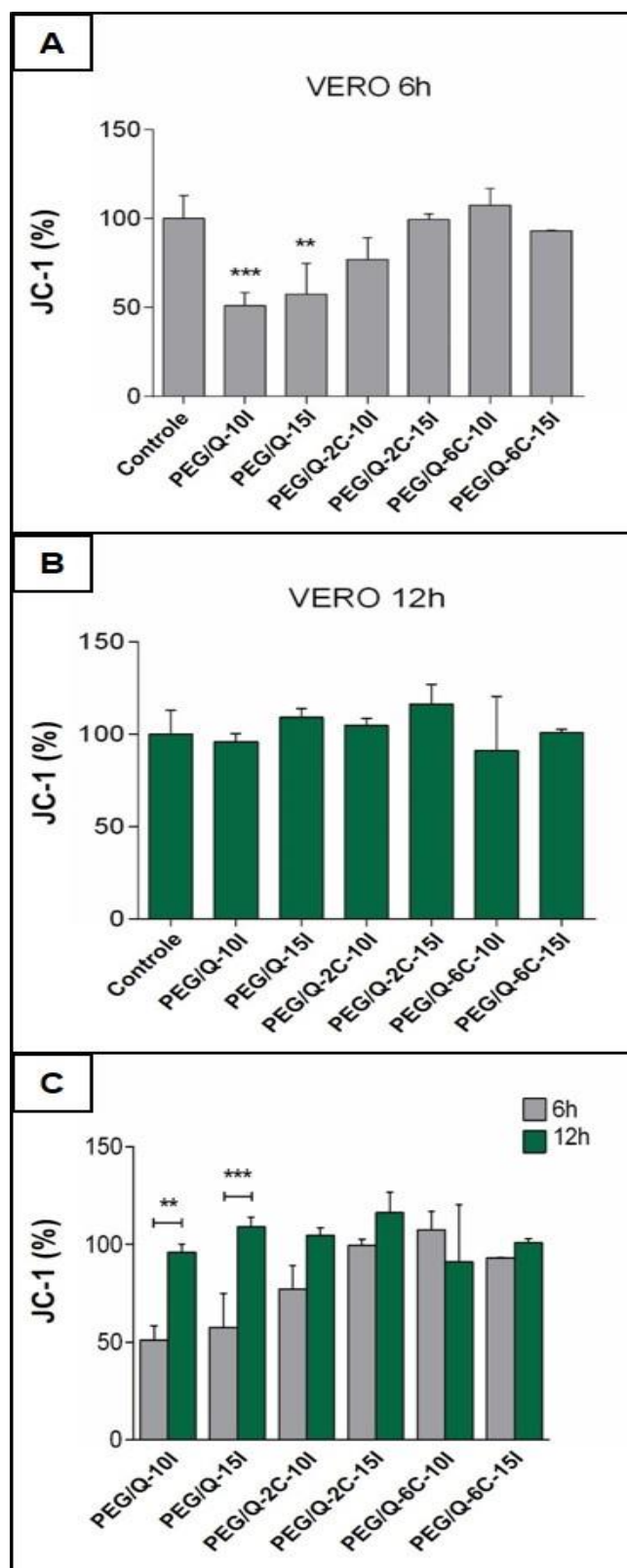


Figura 40: Análise do potencial de membrana mitocondrial por JC-1 dos hidrogeis em linhagem de células VERO em (a) 6 h, (b) 12 h e (c) comparativo entre os tempos os tempos de análise.

6 CONCLUSÕES

Colágeno foi extraído da pele de tilápia com êxito. Para isso, o subproduto foi tratado em soluções diferentes para determinar qual protocolo melhor auxiliaria a extração da proteína, mostrando que pré-tratamento em solução alcalina diluída prevaleceu para tal. A extração foi feita em ácido acético, resultando em soluções ácidas viscosas contendo a proteína solubilizada, da qual foi purificada por *salting-out*. O *salting-out* foi realizado utilizando cloreto de sódio ou sulfato de amônio em duas concentrações diferentes, prevalecendo a utilização de concentrações baixas para isolar o colágeno(I). A presença das proteínas da pele de tilápia foi observada pelo perfil de SDS-PAGE, onde é mostrado a presença de fragmentos das cadeias de colágeno(I), o maior grau de pureza da mesma ao ser purificado com NaCl à $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ por 24 h, sendo observado, também, a presença da estrutura terciária por FTIR-ATR e DC para a mesma amostra. Não foi observado sinais de transição nas análises de DSC, indicando que a proteínas sofreu desnaturação durante o procedimento.

O colágeno foi, então, utilizado na preparação de hidrogéis contendo PEG e quitosana. Primeiramente o PEG foi funcionalizado utilizando anidrido metacrílico, de forma a obter grupos reticulantes nas extremidades do polímero, que é comprovado pelo espectro de RMN ^1H . Desta forma, os hidrogéis foram preparados pela reticulação entre as ligações duplas do grupo metacrilato utilizando PSP e TEMED como iniciador e ativador, respectivamente, em duas quantidades diferentes. Além disso, foram estudados hidrogéis contendo apenas PEG e quitosana em sua composição e hidrogéis contendo duas concentrações diferentes de colágeno.

O MEV permite observar a morfologia fibrosa e porosa das amostras de hidrogel PEG/Q-2C-10I e PEG/Q-2C-15I, proveniente principalmente do colágeno. Porém, também é observado que as amostras dos hidrogéis PEG/Q-6C-10I e PEG/Q-6C-15I não apresentaram a mesma estrutura fibrosa, o que pode estar relacionado ao colapso dos poros durante a liofilização das amostras e a tendência da quitosana em formar membranas, característica esta observada em todas as amostras de hidrogéis. Apesar de não apresentarem a porosidade superficial, a cinética de absorção de água apresentada pelo grau de intumescimento dos hidrogéis mostram que os mesmos possuíam um grau de

porosidade interna à estrutura, visto que as amostras apresentaram um perfil intumescimento elevado e satisfatório, com valores superiores para as amostras contendo apenas PEG-MA e quitosana e uma diminuição do grau de intumescimento com a adição do colágeno à rede, concordando com a cinética de intumescimento reportada na literatura.

Os espectros de FTIR-ATR mostram a presença do colágeno nos hidrogéis, em sinais comuns à quitosana, porém, gradualmente mais intensos com o aumento da concentração de colágeno. A presença do colágeno também pode ser observada pelos termogramas de TGA, apresentando um perfil de perda de massa em 3 etapas distintas, podendo afirmar que a reticulação acontece apenas entre PEG-MA e a quitosana, visto que é observada a degradação do colágeno em 324 °C, logo é formado uma rede semi-interpenetrante.

Foram realizados ensaios biológicos de adesão celular e citotoxicidade dos hidrogéis em uma linhagem de células VERO. Foi possível observar que os hidrogéis contendo colágeno e preparados com 15 mmol de ativador e iniciador apresentaram melhor adesividade celular em 6 h de análise, enquanto que, em 12 h de análise, houve uma queda no número de células aderidas no mesmo hidrogel, porém, apresentou número constante de células aderidas nos hidrogéis preparados com 10 mmol de ativador e iniciador. A citotoxicidade foi avaliada pela redução do reagente MTT em formazan, onde é observado tendência de diminuição no metabolismo mitocondrial, porém, não apresentando relevância estatística entre as amostras. Além disso, o potencial da membrana mitocondrial avaliado por JC-1 demonstra que há uma perda de eficiência da cadeia respiratória em 6 h de análise dos hidrogéis contendo apenas PEG e quitosana, da qual não se mantém em 12 h de análise, sendo possível observar, também, que os hidrogéis preparados com 15 mmol de ativador e iniciador apresentam melhores respostas ao JC-1. Portanto pode-se afirmar que os hidrogéis não possuem potencial citotóxico.

Por fim, foram obtidos resultados satisfatórios à hipótese inicial do trabalho em ambiente *in vitro*. Novos estudos devem ser realizados para avaliar as propriedades mecânicas dos hidrogéis bem como ensaios biológicos *in vitro* devem ser aprofundados para melhor avaliar a viabilidade do material e assim, avançar para aplicações *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (W.H. Freeman, 2013).
2. Beier, G. & Engel, J. The Renaturation of Soluble Collagen. Products Formed at Different Temperatures *. *Biochemistry* **5**, 2744–2755 (1966).
3. Lee, C. H., Singla, A. & Lee, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* **221**, 1–22 (2001).
4. El-Rashidy, A. A. Gad, A., Abu-Hussein, A. E. G., Habib, S. I., Badr, N. A., Hasem, A. A. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticas*) fish scale collagen. *Int. J. Biol. Macromol.* **79**, 618–626 (2015).
5. Huang, C.-Y., Kuo, J.-M., Wu, S.-J. & Tsai, H.-T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food Chem.* **190**, 997–1006 (2016).
6. Li, J., Chen, J. & Kirsner, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* **25**, 9–18 (2007).
7. Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1531–1546 (2003).
8. Silvipriya, K. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *J. Appl. Pharm. Sci.* 123–127 (2015).
9. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. & Tanaka, M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* **89**, 363–372 (2005).
10. Mahboob, S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 4296–4305 (2015).
11. Chen, J. Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., Hong, B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Sci. Technol.* **66**, 453–459 (2016).
12. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 3–12 (2002).

13. Cheema, U., Ananta, M. & Mudera, V. Collagen: Applications of a Natural Polymer in Regenerative Medicine. *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater* (2011).
14. Privalov, P. L. & Gill, S. J. Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction. in *Advances in Protein Chemistry* (eds. Anfinsen, C. B., Edsall, J. T., Richards, F. M. & Eisenberg, D. S.) vol. 39 191–234 (Academic Press, 1988).
15. Sánchez, A. & Vázquez, A. Bioactive peptides: A review. *Food Qual. Saf.* **1**, 29–46 (2017).
16. Anfinsen, C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Sci. New Ser.* **181**, 223–230 (1973).
17. Masuda, N., Kitamura, N. & Saito, K. Primary structure of protein moiety of *Penicillium notatum* phospholipase B deduced from the cDNA. *Eur. J. Biochem.* **202**, 783–787 (1991).
18. Stoltzfus, R. J. Defining Iron-Deficiency Anemia in Public Health Terms: A Time for Reflection. *J. Nutr.* **131**, 565S-567S (2001).
19. Boström, E. A. & Lira-Junior, R. Non-Malignant Blood Disorders and Their Impact on Oral Health: an Overview. *Curr. Oral Health Rep.* **6**, 161–168 (2019).
20. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. Secondary Structure: Polypeptide Chains Can Fold Into Regular Structures Such as the Alpha Helix, the Beta Sheet, and Turns and Loops. *Biochem. 5th Ed.* (2002).
21. Trevino, S. R., Schaefer, S., Scholtz, J. M. & Pace, C. N. Increasing Protein Conformational Stability by Optimizing β -Turn Sequence. *J. Mol. Biol.* **373**, 211–218 (2007).
22. Ronsin, O., Caroli, C. & Baumberger, T. Preferential hydration fully controls the renaturation dynamics of collagen in water-glycerol solvents. *Eur. Phys. J. E* **40**, 55 (2017).
23. Dill, K. A. Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* **24**, 1501–1509 (1985).
24. Pace, C. N. Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 14–17 (1990).
25. Wilcox, G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **26**, 19–39 (2005).

26. Algoe, S. B., Kurtz, L. E. & Grewen, K. Oxytocin and Social Bonds: The Role of Oxytocin in Perceptions of Romantic Partners' Bonding Behavior. *Psychol. Sci.* **28**, 1763–1772 (2017).
27. Fruton, J. S. A history of pepsin and related enzymes. *Q. Rev. Biol.* **77**, 127–147 (2002).
28. Ugidos-Rodríguez, S., Matallana-González, M. C. & Sánchez-Mata, M. C. Lactose malabsorption and intolerance: a review. *Food Funct.* **9**, 4056–4068 (2018).
29. Raaij, M. J. van & Mitraki, A. Natural Fibrous Proteins: Structural Analysis, Assembly, and Applications. in *Proteins in Solution and at Interfaces* 219–232 (John Wiley & Sons, Ltd, 2013). doi:10.1002/9781118523063.ch11.
30. Wang, X., Kim, H. J., Wong, C., Vepari, C., Matsumoto, A., Kaplan, D. L. Fibrous proteins and tissue engineering. *Mater. Today* **9**, 44–53 (2006).
31. Fleischmajer, R., MacDonald, E. D., Perlish, J. S., Burgeson, R. E. & Fisher, L. W. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J. Struct. Biol.* **105**, 162–169 (1990).
32. Niyibizi, C. & Eyre, D. R. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect. Tissue Res.* **20**, 247–250 (1989).
33. Von der Mark, K. Localization of collagen types in tissues. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* **9**, 265–324 (1981).
34. Aberoumand, A. Comparative Study Between Different Methods of Collagen Extraction from Fish and its Properties. in (2012).
35. Elstow, S. F. & Weiss, J. B. Extraction, Isolation and Characterization of Neutral Salt Soluble Type V Collagen from Fetal Calf Skin. *Coll. Relat. Res.* **3**, 181–193 (1983).
36. Wang, Z. Isolation and characterization of collagen from the muscle of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **19**, 935–941 (2014).
37. Liu, D, Wei, G., Li. T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., Zhou, P. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem.* **172**, 836–843 (2015).
38. Li, D., Mu, C., Cai, S. & Lin, W. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrason. Sonochem.* **16**, 605–609 (2009).

39. Sun, L., Hou, H., Li, B. & Zhang, Y. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Biol. Macromol.* **99**, 8–14 (2017).
40. Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., Demiate, I. Collagen Extraction Process. *Int. Food Res. J.* **2016** **23**, 913–922 (2016).
41. Wang, W., Zhang, Y., Ye, R. & Zhao, W. Physicochemical characteristics and gelation properties of collagen superfine powder from swine skin: the effects of preheating treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* **51**, 1291–1297 (2016).
42. Ciarlo, A. S., PhD, M. E. P. & PhD, A. N. F. Isolation of Soluble Collagen from Hake Skin (*Merluccius hubbsi*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **6**, 65–77 (1997).
43. GELITA - Perfil da Empresa. **GELITA**, 2019. Disponível em: <https://www.gelita.com/pt-pt/empresa/perfil>. Acesso em 6 de fevereiro de 2021.
44. Gelnex - The Gelatin Specialists. **Gelnex - The Gelatin Specialist**. Disponível em: <https://www.gelnex.com.br/pt/>. Acesso em 6 de fevereiro de 2021.
45. Subhan, F., Ikram, M., Shehzad, A. & Ghafoor, A. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 4703–4707 (2015).
46. Robert K. Scopes. *Protein purification*. (Springer-Verlag, 1994).
47. Principle and Protocol of Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). **Creative Biomart Blog**, 17 de nov. de 2017. Disponível em: <https://www.creativebiomart.net/blog/principle-and-protocol-of-sodium-dodecyl-sulphate-polyacrylamide-gel-electrophoresis-sds-page/>. Acesso em 6 de fevereiro de 2021.
48. O seu gel SDS-PAGE corado com a rapidez que você exige! **Blog | Scienco Biotech**, 1 de ago. de 2019. Disponível em: <http://www.scienco.bio.br/blog/o-seu-gel-sds-page-corado-com-a-rapidez-que-voce-exige/>. Acesso em 26 de set de 2020.
50. Rodríguez, M. I. A., Barroso, L. G. R. & Sánchez, M. L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J. Cosmet. Dermatol.* **17**, 20–26 (2018).

51. Meena, C., Mengi, S. A. & Deshpande, S. G. Biomedical and industrial applications of collagen. *Proc. Indian Acad. Sci. - Chem. Sci.* **111**, 319–329 (1999).
52. Sionkowska, A., Skrzyński, S., Śmiechowski, K. & Kołodziejczak, A. The review of versatile application of collagen. *Polym. Adv. Technol.* **28**, 4–9 (2017).
53. Leitinger, B. & Hohenester, E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **26**, 146–155 (2007).
54. Secchi, G. Role of protein in cosmetics. *Clin. Dermatol.* **26**, 321–325 (2008).
55. Li, G. Y., Fukunaga, S., Takenouchi, K. & Nakamura, F. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 101–106 (2005).
56. Nagelschmidt, M. & Struck, H. Kollagen als cosmeticum? *Arch. Für Dermatol. Forsch.* **250**, 237–243 (1974).
57. Peng, Y., Glattauer, V., Werkmeister, J. A. & Ramshaw, J. A. M. Evaluation for collagen products for cosmetic application. *J. Cosmet. Sci.* **55**, 327–341 (2004).
58. Proksch, E. Oral Intake of Specific Bioactive Collagen Peptides Reduces Skin Wrinkles and Increases Dermal Matrix Synthesis. *Skin Pharmacol. Physiol.* **27**, 113–119 (2014).
59. Kanagaraj, J., Velappan, K. C., Babu, N. K. C. & Sadulla, S. Solid wastes generation in the leather industry and its utilization for cleaner environment-A review. *JSIR Vol6507 July 2006* (2006).
60. Cabeza, L. F. Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein products and chromium. *Waste Manag.* **18**, 211–218 (1998).
61. D. Covington, A. Modern tanning chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **26**, 111–126 (1997).
62. Rao, R. J., Thanikaivelan, P. & Nair, B. An eco-friendly option for less-chrome and dye-free leather processing: in situ generation of natural colours in leathers tanned with Cr–Fe complex. *Clean Technol. Environ. Policy* **4**, 115–121 (2002).

63. Ragaert, K., Van de Velde, S., Cardon, L. Rapid manufacturing of collagen scaffolds for cardiac tissue engineering. **Conference: Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping**. Leiria, Portugal (2013).
64. Huang, S., Yang, Y., Yang, Q., Zhao, Q. & Ye, X. Engineered circulatory scaffolds for building cardiac tissue. *J. Thorac. Dis.* **10**, S2312–S2328 (2018).
65. Tedder, M. E. Stabilized Collagen Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **15**, 1257–1268 (2009).
66. Ojeh, N. O., Frame, J. D. & Navsaria, H. A. In Vitro Characterization of an Artificial Dermal Scaffold. *Tissue Eng.*, **7(4)** (2001).
67. MacNeil, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater. Today* **11**, 26–35 (2008).
68. Ahn, S. Designed Three-Dimensional Collagen Scaffolds for Skin Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part C: Methods*, **16(5)** (2009).
69. Silver, F. H. & Pins, G. Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J. Long. Term Eff. Med. Implants* **2**, 67–80 (1992).
70. Rose, F. R. A. J. & Oreffo, R. O. C. Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 1–7 (2002).
71. Cunniffe, G. M. & O'Brien, F. J. Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine. *JOM* **63**, 66 (2011).
72. Sanz-Herrera, J. A., García-Aznar, J. M. & Doblaré, M. Simulation of Bone Remodelling and Bone Ingrowth within Scaffolds. *Key Engineering Materials* **377**, 225-273.
73. Duan, X., McLaughlin, C., Griffith, M. & Sheardown, H. Biofunctionalization of collagen for improved biological response: Scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 78–88 (2007).
74. Fagerholm, P. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials* **35**, 2420–2427 (2014).
75. Matthyssen, S., Van den Bogerd, B., Dhubhghaill, S. N., Koppen, C. & Zakaria, N. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomater.* **69**, 31–41 (2018).
76. Khan, R. & Khan, M. H. Use of collagen as a biomaterial: An update. *J. Indian Soc. Periodontol.* **17**, 539–542 (2013).

77. Fu, J.-H., Zao, M., Lin, Y.-R., Wang, Y.-D., Wang, Z.-X., Wang, L.-X. Degradable Chitosan-Collagen Composites Seeded with Cells as Tissue Engineered Heart Valves. *Heart Lung Circ.* **26**, 94–100 (2017).
78. Ao, H.-Y., Xie, Y.-T., Yang, S.-B., Wu, X.-D., Li, K., Zheng, X.-B., Tang, T.-T. Covalently immobilised type I collagen facilitates osteoconduction and osseointegration of titanium coated implants. *J. Orthop. Transl.* **5**, 16–25 (2016).
79. El-Jawhari, J. J., Sanjurjo-Rodriguez, C., Jones, E. & Giannoudis, P. V. Collagen-containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone marrow multipotential stromal cells. *J. Orthop. Res.* **34**, 597–606 (2016).
80. Ng, A. L. K., Chan, T. C. Y. & Cheng, A. C. K. Conventional versus accelerated corneal collagen cross-linking in the treatment of keratoconus. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **44**, 8–14 (2016).
81. Sng, C. C. A., Wang, J., Hau, S., Htoon, H. M. & Barton, K. XEN-45 collagen implant for the treatment of uveitic glaucoma. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **46**, 339–345 (2018).
82. Kallis, P. J. & Friedman, A. J. Collagen Powder in Wound Healing. *J. Drugs Dermatol.* **17**, 403–408 (2018).
83. Atkinson, A., Renziehausen, A., Wang, H., Nigro, C. L., Lattanzio, L., Merlano, M., Rao, B., Weir, L., Evans, A., Matin, R., Harwood, C., Szlosarek, P., Pickering, J. G., Fleming, C., Sim, V. R., Li, S., James, T. V., Raines, R. T., Boniol, M., Thompson, A., Proby, C., Crook, T., Nelofer, S. Collagen Prolyl Hydroxylases Are Bifunctional Growth Regulators in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 1118–1126 (2019).
84. Mistry, K., Vanhoecke, B., Prawitt, J., Labus, M., Lovat, P., McConnell, A. Potentiating cutaneous wound healing with type I collagen peptides. *Br. J. Dermatol.* **180**, E212–E212 (2019).
85. Hakuta, A., Yamaguchi, Y., Okawa, T., Yamamoto, S., Sakai, Y., Aihara, M. Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* **88**, 357–364 (2017).
86. Sheikh, Z., Qureshi, J., Alshahrani, A. M., Nassar, H., Ikeda, Y., Glogauer, M., Ganss, B. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology* **105**, 1–12 (2017).

87. Hass, V., Luque-Martinez, I. V., Gutierrez, M. F., Moreira, C. G., Gotti, V. B., Feitosa, V. P., Koller, G., Otuki, M. F., Loguercio, A. D., Reis, A. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent. Mater.* **32**, 732–741 (2016).
88. Breschi, L., Maravic, T., Cunha, S. R., Comba, A., Cadenaro, M., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., Mazzoni, A. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent. Mater.* **34**, 78–96 (2018).
89. Lv, D., Zhou, L., Zheng, X. & Hu, Y. Sustained release of collagen VI potentiates sciatic nerve regeneration by modulating macrophage phenotype. *Eur. J. Neurosci.* **45**, 1258–1267 (2017).
90. Cescon, M., Gregorio, I., Eiber, N., Borgia, D., Fusto, A., Sabatelli, P., Scorzeto, M., Megighian, A., Pegoraro, E., Hashemolhosseini, S., Bonaldo, P. Collagen VI is required for the structural and functional integrity of the neuromuscular junction. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **136**, 483–499 (2018).
91. Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E. & Oyen, M. L. Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta Biomater.* **41**, 193–203 (2016).
92. Yannas, I. V. Tissue regeneration by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Clin. Mater.* **9**, 179–187 (1992).
93. Deligkaris, K., Tadele, T. S., Olthuis, W. & van den Berg, A. Hydrogel-based devices for biomedical applications. *Sens. Actuators B Chem.* **147**, 765–774 (2010).
94. Wichterle, O. & Lím, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
95. Akhtar, M. F., Hanif, M. & Ranjha, N. M. Methods of synthesis of hydrogels: A review. *Saudi Pharm. J.* **24**, 554–559 (2016).
96. Yonezawa, U. G. **Síntese, caracterização e aplicação de hidrogéis nanoestruturados contendo nanoargila para melhorar a germinação e qualidade de muda de hortaliça.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

97. Kirschner, C. M. & Anseth, K. S. Hydrogels in Healthcare: From Static to Dynamic Material Microenvironments. *Acta Mater.* **61**, 931–944 (2013).
98. Lohani, A., Singh, G., Bhattacharya, S. & Verma, A. Interpenetrating Polymer Networks as Innovative Drug Delivery Systems. *J. Drug Deliv.* **2014**, 11 (2014).
99. Laya, J., Masfisi, S, López, G., Pastrana, J., Sousa, M. G., Peña, G., Gascue, B. R. Hidrogeles semi-interpenetrados de poliacrilamida/poli (vinil alcohol): estudio de su estructura, capacidad de absorción y propiedades mecánicas. *Avances em Química*, **12(2-3)**, 37-40 (2017).
100. Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S. & Phillips, G. O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Prog. Mol. Environ. Bioeng. - Anal. Model. Technol. Appl.* (2011) doi:10.5772/24553.
101. Reis, E. F., Campos, F. S., Lage, A. P., Leite, R. C., Heneine, L. G., Vasconcelos, W. L., Lobato, Z. I. P., Mansur, H. S. Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. *Mater. Res.* **9**, 185–191 (2006).
102. Matyjaszewski, K. Overview: Fundamentals of Controlled/Living Radical Polymerization. in *Controlled Radical Polymerization* vol. 685 2–30 (American Chemical Society, 1998).
103. Junior, S. V. C. *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. (Artliber, 2002).
104. Rebelo, R., Fernandes, M. & Figueiro, R. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Eng.* **200**, 236–243 (2017).
105. DeVolder, R. & Kong, H.-J. Hydrogels for in vivo-like three-dimensional cellular studies. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **4**, 351–365 (2012).
106. R, R., Venkatesan, J., Kim, S. & P.N., S. Biomedical Applications of Chitosan: An Overview. *J. Biomater. Tissue Eng.* **2**, 100–111 (2012).
107. Balan, V. & Verestiuc, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *Eur. Polym. J.* **53**, 171–188 (2014).
108. Wong, C., Shital, P., Chen, R., Owida, A. & Morsi, Y. Biomimetic electrospun gelatin–chitosan polyurethane for heart valve leaflets. *J. Mech. Med. Biol.* **10**, 563–576 (2010).

109. Enrione, J., Osorio, F., López, D., Weinstein-Oppenheimer, C., Fuentes, M. A. Characterization of a Gelatin/Chitosan/Hyaluronan scaffold-polymer. *Electron. J. Biotechnol.* **13**, 0–0 (2010).
110. Chiono, V., Pulieri, E., Vozzi, G., Ciardelli, G., Ahluwalia, A., Giusti, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 889–898 (2008).
111. Xin-Yuan, S. & Tian-Wei, T. New Contact Lens Based on Chitosan/Gelatin Composites: *J. Bioact. Compat. Polym.* (2016).
112. Hsu, S., Hung, K.-C. & Chen, C.-W. Biodegradable polymer scaffolds. *J. Mater. Chem. B* **4**, 7493–7505 (2016).
113. Ahadian, S., Sadeghian, R. B., Salehi, S., Ostrovidov, S., Bae, H., Ramalingam, M., Khademhosseini, A. Bioconjugated Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1984–2001 (2015).
114. Almany, L. & Seliktar, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* **26**, 2467–2477 (2005).
115. Callahan, L. A. S., Ganos, A. M., McBurney, D. L., Dilisio, M. F., Weiner, S. D., Horton, W. E., Becker, M. L. ECM Production of Primary Human and Bovine Chondrocytes in Hybrid PEG Hydrogels Containing Type I Collagen and Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* **13**, 1625–1631 (2012).
116. Li, Y., Wang, X., Wei, Y., Tao, L. Chitosan-based self-healing hydrogel for bioapplications. *Chinese Chemical Letters*, Vol **28(11)**, 2053-2057 (2017).
117. Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., Dehghani, F. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **16**, 371–383 (2010).
118. Zuidema, J. M., Rivet, C. J., Gilbert, R. J. & Morrison, F. A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **102**, 1063–1073 (2014).
119. Leone, G. & Barbucci, R. Polysaccharide Based Hydrogels for Biomedical Applications. in *Hydrogels: Biological Properties and Applications* (ed. Barbucci, R.) 25–41 (Springer Milan, 2009).
120. Bae, K. H., Wang, L.-S. & Kurisawa, M. Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *J. Mater. Chem. B* **1**, 5371–5388 (2013).

121. Ottenbrite, R. M, Park, K., Okano, T. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. (Springer-Verlag, 2010).
122. Pourjavadi, A. & Kurdtabar, M. Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: Synthesis and characteristics. *Eur. Polym. J.* **43**, 877–889 (2007).
123. Helary, C. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. *Biomaterials* **31**, 481–490 (2010).
124. Lou, J., Stowers, R., Nam, S., Xia, Y. & Chaudhuri, O. Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture. *Biomaterials* **154**, 213–222 (2018).
125. Nakaji-Hirabayashi, T., Kato, K. & Iwata, H. *In Vivo* Study on the Survival of Neural Stem Cells Transplanted into the Rat Brain with a Collagen Hydrogel That Incorporates Laminin-Derived Polypeptides. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1798–1804 (2013).
126. Wang, L., Stegemen, J. P. Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration. *Acta Biomater.* **7**, 2410–2417 (2011).
127. Rafat, M., Li, F., Fagerholm, P., Lagali, N. S., Watsky, M. A., Munger, R., Matsuura, T., Griffith, M. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen–chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials* **29**, 3960–3972 (2008).
128. Sargeant, T. D., Desai, A. P., Banerjee, S., Agawu, A. & Stopek, J. B. An in situ forming collagen–PEG hydrogel for tissue regeneration. *Acta Biomater.* **8**, 124–132 (2012).
129. Li, J. & Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* **1**, (2016).
130. Parenteau, N. Skin: The first tissue-engineered products. *Sci. Am.* **280**, 83–84 (1999).
131. Anurov, M. V., Titkova, S. M. & Oettinger, A. P. Biomechanical compatibility of surgical mesh and fascia being reinforced: dependence of experimental hernia defect repair results on anisotropic surgical mesh positioning. *Hernia* **16**, 199–210 (2012).

132. Bernard, M., Jubeli, E., D. Pungente, M. & Yagoubi, N. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices – regulations, in vitro screening and risk-management. *Biomater. Sci.* **6**, 2025–2053 (2018).
133. De Jong, W. H., Carraway, J. W. & Geertsma, R. E. 7 - In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. in *Biocompatibility and Performance of Medical Devices* (ed. Boutrand, J.-P.) 120–158 (Woodhead Publishing, 2012).
134. Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–4200 (2010).
135. Khalili, A. & Ahmad, M. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 18149–18184 (2015).
136. Sackmann, E. & Smith, A.-S. Physics of cell adhesion: Some lessons from cell-mimetic systems. *Soft Matter* **10**, 1644–59 (2014).
137. Zhou, D. W. & García, A. J. Measurement Systems for Cell Adhesive Forces. *J. Biomech. Eng.* **137**, (2015).
138. Boureux, A., Vignal, E., Faure, S. & Fort, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 203–216 (2007).
139. Kapuscinski, J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech. Histochem.* **70**, 220–233 (1995).
140. Takezawa, Y. *et al.* β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci. Rep.* **1**, 68 (2011).
141. Mestre, T., Figueiredo, J., Ribeiro, A. S., Paredes, J., Seruca R., Sanches, J. M. Quantification of topological features in cell meshes to explore E-cadherin dysfunction. *Sci. Rep.* **6**, 25101 (2016).
142. Smith, D., Hernam, C., Razdan, S., Abedin, M. R., Van Stoecker, W., Barua, S. Microparticles for Suspension Culture of Mammalian Cells. *ACS Appl. Bio Mater.* **2**, 2791–2801 (2019).
143. Dehnavi, N., Parivar, K., Goodarzi, V., Salimi, A. & Nourani, M. R. Systematically engineered electrospun conduit based on PGA/collagen/bioglass nanocomposites: The evaluation of morphological, mechanical, and bio-properties. *Polym. Adv. Technol.* **30**, 2192–2206 (2019).
144. Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - Predict. Risk Our Actual World* (2017).

145. Im, J., Assays, C. & Mosmann, T. *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and*. (1983).
146. Vega-Avila, E. & Pugsley, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **54**, 10–14 (2011).
147. Lenaz, G., Bovina, C., Castelluccio, C., Cavazzoni, M., Estornell, E., Fato, R., Pich, M. M., Pallotti, F., Casteneli, G. P., Rauchova, H. Modes of coenzyme Q function in electron transfer. *Protoplasma* **184**, 50–62 (1995).
148. Sgonc, R. & Gruber, J. Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.* **33**, 525–533 (1998).
149. Garner, D. L., Thomas, C. A., Joerg, H. W., DeJarnette, J. M. & Marshall, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* **57**, 1401–1406 (1997).
150. Sivandzade, F., Bhalerao, A. & Cucullo, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protoc.* **9**, (2019).
151. Lin-Gibson, S., Bencherif, S., Cooper, J. A., Wetzel, S. J., Antonucci, J. M., Vogel, B. M., Horkay, F., Washburn, N. R. Synthesis and Characterization of PEG Dimethacrylates and Their Hydrogels. *Biomacromolecules* **5**, 1280–1287 (2004).
152. Hao, J.-Q., Li, H. & Woo, H.-G. Synthesis and characterization of cholic acid-containing biodegradable hydrogels by photoinduced copolymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **112**, 2976–2980 (2009).
153. Arumugam, G. K. S., Sharma, D., Balakrishnan, R. M. & Ettiyappan, J. B. P. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustain. Chem. Pharm.* **9**, 19–26 (2018).
154. Schuetz, T., Richmond, N., Harmon, M. E., Schuetz, J., Castaneda, L., Slowinska, K. The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **101**, 118–125 (2013).
155. Wang, L. Liang, Q., Wang, Z., Xu, J., Liu, Y., Ma, H. Preparation and characterisation of type I and V collagens from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Chem.* **148**, 410–414 (2014).

156. Wu, J., Zhihong, L., Xiaoyan, Y., Pengfei, W., Yongqing, L., He, W. Extraction and isolation of type I, III and V collagens and their SDS-PAGE analyses. *Trans. Tianjin Univ.* **17**, 111 (2011).
157. Meng, D., Tanaka, H., Kobayashi, T., Hatayama, H., Zang, L., Ura, K., Yunoki, S., Takagi, Y. The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products. *International Journal of Biological Macromolecules.* **131**, 572-580 (2019).
158. Sotelo, C. G., Comesaña, M. B., Ariza, P. R. & Pérez-Martín, R. I. Characterization of Collagen from Different Discarded Fish Species of the West Coast of the Iberian Peninsula. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **25**, 388–399 (2016).
159. Gautam, S., Chou, C.-F., Dinda, A. K., Potdar, P. D. & Mishra, N. C. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **34**, 402–409 (2014).
160. Fernandez-Cervantes, I., Rodríguez-Fuentes, N., León-Deniz, L. V., Quintana, L. E. A., Cervantes-Uc, J. M., Kao, W. A. H., Cerón-Espinosa, J. D., Cauich-Rodríguez, J. V., Castaño-Meneses, V. M. Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **111**, 110748 (2020).
161. Bozec, L. & Odlyha, M. Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **101**, 228–236 (2011).
162. León-Mancilla, B. H., Araiza-Téllez, M. A., Flores-Flores, J. O. & Piña-Barba, M. C. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *J. Appl. Res. Technol.* **14**, 77–85 (2016).
163. de Campos Vidal, B. & Mello, M. L. S. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* **42**, 283–289 (2011).
164. Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. & Duodu, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem.* **86**, 325–332 (2004).

165. Lie. Thermal dehydration treatment and glutaraldehyde cross-linking to increase the biostability of collagen–chitosan porous scaffolds used as dermal equivalent. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **14**, 861–874 (2003).
166. Matcham, S. & Novakovic, K. Fluorescence Imaging in Genipin Crosslinked Chitosan–Poly(vinyl pyrrolidone) Hydrogels. *Polymers* **8**, 385 (2016).
167. Manickam, B., Sreedharan, R. & Elumalai, M. ‘Genipin’ – The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview. *Curr. Drug Deliv.* **11**, 139–145 (2014).
168. Ravi Kumar, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, 1–27 (2000).
169. Jiménez-Saelices, C., Seantier, B., Cathala, B. & Grohens, Y. Effect of freeze-drying parameters on the microstructure and thermal insulating properties of nanofibrillated cellulose aerogels. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **84**, 475–485 (2017).
170. Kim, B.-S. & Mather, P. T. Amphiphilic Telechelics Incorporating Polyhedral Oligosilsesquioxane: 1. Synthesis and Characterization. *Macromolecules* **35**, 8378–8384 (2002).
171. Santos, J. E., Soares, J. P., Dockal, E. R., Campa Filho, S. P., Cavalheiro, E. T. G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. *Polímeros; Ciência e Tecnologia* **13**, 242-249 (2003).
172. Fernandes Queiroz, M., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sasaki, G. L. & Rocha, H. A. O. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Mar. Drugs* **13**, 141–158 (2015).
173. Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W. & Hussein, M. Z. Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets. *Polymers* **6**, 93–104 (2014).
174. Jeon, M. S., Jeon, Y., Hwang, J. H., Heu, C. D., Jin, S., Shin, J., Song, Y., Kim, S. C., Cho, B.-K., Lee, J.-K., Kim, D. R. Fabrication of three-dimensional porous carbon scaffolds with tunable pore sizes for effective cell confinement. *Carbon* **130**, 814–821 (2018).

8 APÊNDICE

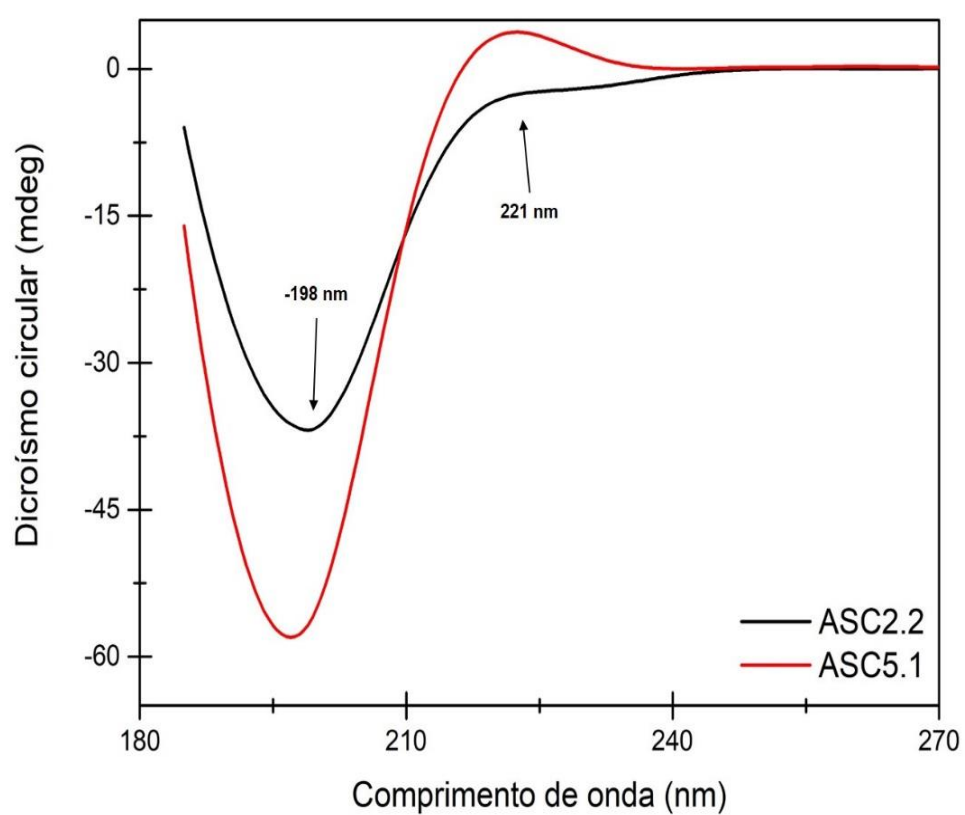


Figura 41: Espectro de dicroísmo circular de duas soluções-mãe de colágeno: ASC2.2 e ASC5.1

Tabela 9: Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento para os hidrogéis com diferentes quantidades de colágeno depois de 20 h.

Grupo	Q (%)
A0	2084,01 ± 77
A1	1347,61 ± 80
A2	1292,65 ± 180
B0	2041,57 ± 24
B1	1685,74 ± 32
B2	1076,90 ± 120