SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL
MESTRADO PROFISSIONAL

Katherine Elice Paes Leão Coelho

OBTENÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO DE PEIXE PARA BIOMATERAIS: PEIXES DA AMAZÔNIA (*Heros severus* e *Cichla temensis*) E TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Belém - PA
2023

KATHERINE ELICE PAES LEÃO COELHO

OBTENÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO DE PEIXE PARA BIOMATERAIS: PEIXES DA AMAZÔNIA (*Heros severus* e *Cichla temensis*) E TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação submetida ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal do Pará para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Industrial.

Orientadora: Prof.ª Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias.

Coorientador Prof. Dr. Aladim Gomes Lameira.

Belém - PA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C672o Coelho, Katherine Elice Paes Leão Coelho.
OBTENÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO DE PEIXE PARA BIOMATERAIS: PEIXES DA AMAZÔNIA (Heros severus e Cichla temensis) E TILÁPIA DO NILO (Oreochromis niloticus) / Katherine Elice Paes Leão Coelho Coelho. — 2023.
75 f. : il. color.

Orientador(a): Profª. Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias Dias
Coorientador(a): Prof. Dr. Aladim Gomes Lameira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Belém, 2023.

1. Filme de colágeno. 2. Eletrofiação. 3. Amazônia. 4. Peixe. 5. Engenharia de tecidos. I. Título.

CDD 607.2

KATHERINE ELICE PAES LEÃO COELHO

OBTENÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO DE PEIXE PARA BIOMATERAIS: PEIXES DA AMAZÔNIA (*Heros severus* e *Cichla temensis*) E TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação submetida ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal do Pará para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Industrial.

Orientadora: Prof.ª Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias

Coorientador: Prof. Dr. Aladim Gomes Lameira.

Belém – PA, 20 de outubro de 2023.

Banca Examinadora

_____

Prof.ª Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias
Orientadora

_____

Prof. Dr. Aladim Gomes Lameira
Coorientador

_____

Prof. Dr. Paulo Cordeiro Machado
Membro Interno

_____

Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila
Membro Externo

Dedico a Deus e a minha família, por todo amor, confiança e apoio.
Dedico também a todos que me apoiaram para realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estudar, por ter me dado forças para continuar, por nunca falhar comigo e por sempre cumprir com Suas promessas em minha vida.

Agradeço aos meus pais, meus irmãos, a minha filha Amy e a Cilene pelo apoio recebido durante minha jornada acadêmica.

Agradeço aos meus professores pelo conhecimento repassado, pela orientação, por contriburem para minha formação profissional.

Agradeço aos meus amigos e familiares que incetivaram-me a continuar, torcendo por meu sucesso.

Agradeço aos meus colegas profissionais que trabalharam comigo arduamente para que esse sonho fosse possível.

RESUMO

Filmes de Colágeno derivados da pele de peixe vêm ganhando destaque na engenharia tecidual, com ênfase no grande número de pesquisas sobre as propriedades daqueles obtidos de Tilápia do Nilo - TN (*Oreochromis niloticus*). Paralelo a isso, a Bacia Amazônica apresenta inúmeras espécies de peixes, os quais ainda não foram abordados profundamente no campo da bioprospecção. Neste sentido, esta pesquisa buscou preparar e analisar filmes derivados de peles de peixes amazônicos, como o Tucunaré –açú - TA (*Cichla Temensis*) e o Acará-severo - AS (*Heros Severus*), comparando-os com o do peixe africano (TN). A partir dos resultados verificou-se que o de TN foi o de que se obteve maior rendimento de colágeno. As proteínas foram extraídas e purificadas para o preparo de soluções aquosas com álcool polivinílico. Os filmes obtidos por evaporação de solvente apresentaram os seguintes resultados de resistência à tração: 327 MPa para TN; 299 MPa para AS e 228 MPa para TA. Por microscopia eletrônica de varredura foi possível notar que a maior porosidade estava presente em filmes de TN, os quais receberam revestimento de esferas e nanofibras depositas a uma distância de 3 cm sob tenção de 6,3 KW geradas em fonte COCKCROFT – WALTON. Portanto, verificou-se que apesar de os polímeros de TA e AS apresentarem bons resultados, os filmes elaborados a partir de Tilápia foram os que melhor corroboraram com os de biomateriais de uso odontológico. Por fim, acredita-se que os de peixes amazônicos possibilitaram a reprodução de métodos já aplicados com veemência na literatura e podem vir a suprir as necessidades mercadológicas.

Palavras-chave: Filme de colágeno; Eletrofiação; Amazônia; Peixe; Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

The Collagen films derived from fish skin have been gaining prominence in tissue engineering, with emphasis on the large number of research on the properties of those obtained from Nile Tilapia - TN (*Oreochromis niloticus*).Parallel to this; the Amazon Basin has numerous species of fish, which have not yet been deeply addressed in the field of bioprospecting. In this sense, this paper sought to prepare and analyze films derived from the skins of Amazonian fish, such as Peacock Bass - TA (*Cichla Temensis)* and Banded Cichlid - AS (*Heros Severus*), comparing them with that of the African fish TN. From the results obtained, it was verified that TN was the one with the highest collagen yield. The proteins were extracted and purified to prepare aqueous solutions with polyvinyl alcohol. The films obtained by solvent evaporation showed the following traction resistance results: 327 MPa for TN; 299 MPa for AS, and 228 MPa for TA. Through scanning electron microscopy, it was possible to note that the greatest porosity was present in TN films, which received a coating of spheres and nanofibers deposited at a distance of 3 cm under tension of 6.3 KW generated in a COCKCROFT – WALTON source. Therefore, it was found that, although the TA and AS polymers showed good results, the films made from Tilapia were the ones that best corroborated those made from biomaterials for dental use. Finally, it is believed that those using Amazonian fish made it possible to reproduce methods already vehemently applied in the literature and could eventually supply the needs of market.

Keywords: Collagen film; *Electrospinning*; Amazon; Fish; Tissue engineering

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 3.1 – Estrutura do Colágeno Tipo 1 em 2 modelos coloridos de tripla hélice com 300nm de comprimento. É possível observar a composição de aminoácidos sendo a glicina (Gy) em branco, a prolina (X) cinza e a hidroxiprolina (Y) em roxo. 22

Figura 3.2 – Fontes de colágeno. 23

Figura 3.3- Aplicabilidade do colágeno na indústria 25

Figura 3.4 - Soluções formadoras dos filmes (a). Filmes resultantes formados após o processamento. Sendo o filme controle tratado com 10kGy, e os outros tratados com 25kGy respectivamente (b).....27

Figura 3.5 – Esquema ilustrando a preparração de uma membrana com bilaminar aplicada em ferimentos de ratos, a mesma foi produzida nos seguintes elementos: Colágeno mineralizado(MC), Quitosana(CS), Barberina (BER - ervas chinesas), policaprolactona (PCL)/polivinilpirrolidona (PVP).....29

Figura 3.6 - Membrana produzida a partir de hidrogéis de alcóol povilínico (PVA) misturado com colágeno (Col) proveniente de pele de Tilápia do Nilo promevendo a adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal e da gengiva 30

Figura 3.7 - Preparação da pele de tilápia, preparação, fabricação da matriz dérmica acelular de pele da tilápia. Aplicação na ferida cirúrgica em ratos. Evolução da cicatrização.....34
4

Figura 3.8 - Anatomia do Tucunaré – açu.....36
6

Figura 4.1 – Fluxograma do processo de extração do colágeno da pele de peixe. 378

Figura 4.2 – Fluxograma da extração e pu **r**ificação do colágeno 38

Figura 4.3 – Esquema para demonstrar as soluções de Colágeno + PVA de cada espécie de peixe.....39

Figura 4.4 – Esquema demonstrativo dos filmes de colágenos obtidos de cada espécie de peixe..... 399

Figura 4.5 – Representação dos filmes de Colágenos recortados em 45 mm x 5 mm x 0,5 mm.....40

Figura 4.6 – Diagrama do processo de *electrospinning* da solução de colágeno selecionada.....41
1

Figura 5.1 – Peles de peixes dissecadas da Tilápia do Nilo (A), Tucunaré-açu (B) e Acará severo (C). Colágeno puro/seco da *Oreochromis niloticus* (C), *Cichla temensis* (E), *Heros severus* (F).....42

Figura 5.2 – (A) Filme de *Oreochromis niloticus* com 10% Colágeno + 90% de Álcool Povilínico. (B) 9amostras do mesmo polímero preparadas e recortadas. (C) Dimensão 45mm x 5mm de cada espécie.....46
6

Figura 5.3 – (A) Filme de *Cichla temensis* com 10% Colágeno + 90% de Álcool Povilínico. (B) 9 amostras do mesmo polímero preparadas e recortadas. (C) Dimensão 45mm x 5mm de cada espécime.....47

Figura 5.4 – (A) Filme de *Heros severus* com 10% Colágeno + 90% de Álcool Povilínico. (B) 9 amostras do mesmo polímero preparadas recortadas. (C) Dimensão 45mm x 5mm de cada espécime.....47

Figura 5.5 – Experimento de mecânico "Pull to break" realizado na máquina universal Emic DL2000 48

Figura 5.6 – Gráfico dos ensaios de tração realizado com os filmes da Tilápia do Nilo 49

Figura 5. 7 – Gráfico dos ensaios de tração realizado com os filmes do Tucunaré-açu..... 50

Figura 5.8 – Gráfico dos ensaios de tração realizado com os filmes do Acará-severo.....51

Figura 5.9 – Filme de colágeno do peixe Tilápia. (A) Filme em repouso. (B) Filme submetido à tração. (C) Início da fratura do polímero.....52

Figura 5.10 – Filme de colágeno do peixe Acará-severo. (A) Filme em repouso. (B) Filme submetido à tração. (C) Início da fratura do polímero.....53

Figura 5.11 – Filme de colágeno do peixe Tucunaré-açu. (A) Filme em repouso. (B) Filme submetido à tração. (C) Início da fratura do polímero.....53

Figura 5.12 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero da espécie *Oreochromis niloticus.* (A) Área de fratura do filme com aumento de 50 μm. (B) Área interna com aumento de 20 μm. (C) Área de Superfície com aumento de 200 μm.....54

Figura 5.13 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero da espécie *Cichla temensis.* (A) Área de fratura do filme com aumento de 50 μm. (B) Área interna com aumento de 20 μm. (C) Área de Superfície com aumento de 200 μm.....54

Figura 5.14 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero da espécie *Heros severus* . (A) Área de fratura do filme com aumento de 50 μm. (B) Área interna com aumento de 20 μm. (C) Área de Superfície com aumento de 200 μm 55 5

Figura 5.15 – Sistema montado seringa para eletrofiação da solução da Tilápia no Nilo + PVA com uma fonte de alta tensão COCKCROFT – WALTON.....57

Figura 5.16. – Microscopia eletrônica da eletrofiação da solução de Tilápia do Nilo + PVA. (A) Imagem com aumento de 50 μm. (B) Imagem com aumento de 20 μm. (C) Imagem com aumento de 10 μm.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Resultados dos testes mecânicos avaliando módulo de elasticidade (MPa), Tensão de ruptura (MPa) e Deformação a fratura (%) dos filmes de colágeno das espécies de peixes.....49

Tabela 5.2 – Comparação dos dados obtidos entre espécies de peixes. Resultado ótimo: +++. Resultado razoável: ++. Resultado Baixo: +
.....56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

α- SMA	*α-Smooth muscle actin*
bFGF	*Fibroblast growth factor*
Col	Colágeno
CS	*Chitosan*
Gly	Glicerina
MEV	Microscópico eletrônico de varredura
PCL	*Polycaprolactone*
PVA	*Poly (vinyl alcohol)*
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
ROG	Regeneração óssea guiada
RTG	Regeneração tecidual guiada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

2. OBEJTIVOS 20

2.1. OBJETIVO GERAL 20

2.2 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS 20

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21

3.1. COLÁGENOS DISPONÍVEIS NOS TECIDOS 21

3.2. FONTES DE COLÁGENO 22

3.3. VANTAGENS DO COLÁGENO DERIVADO DE ANIMAIS AQUÁTICO EM RELAÇÃO AOS TERRESTRES 24

3.4. APLICABILIDADE DO COLÁGENO NA INDÚSTRIA 24

3.5. APLICABILIDADE DOS FILMES DE COLÁGENO 26

3.6. A CORRELAÇÃO DO FILME DE COLÁGENO E A TÉCNICA DE ELECTROSPINNING 27

3.7. APLICABILIDADE DO FILME COLÁGENO DERIVADO DE PEIXE NA ODONTOLOGIA 29

3.8. BIODIVERSIDADES AQUÁTICAS DA AMAZÔNIA E SEUS POTENCIAIS PARA NOVAS DESCOBERTAS 30

3.9. CARACTERÍSTICAS DA TILÁPIA DO NILO (O*reochromis niloticus*) 31

3.10. CARACTERÍSTICAS DO ACARÁ-SEVERO (*Heros severus*) 35

3.11. CARACTERÍSTICAS DO TUCUNARÉ - AÇU (*Cichla temensis*) 35

4. METODOLOGIA 36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

6. CONCLUSÃO 61

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63

APÊNDICE 71

ANEXO 73

1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica vem estudando alternativas para reduzir as morbidades da população, procurando inovar a busca de novos métodos. A literatura já sustenta que a pele de peixe descelularizada é um xenoenxerto que requer pouca fabricação antes de ser usada em ambiete clínico, tornando o produto mais acessível, além de conter propriedades exclusivas semelhantes às estruturas humanas, é composta pricipalmete por colágeno I, que é poroso, antiinflamatório, analgésico e de fácil de armazenamento (FIAKOS; KUANG; LO, 2020).

O uso do colágeno de base marinha vem crescendo devido à propriedades únicas como: nenhum risco de transmissão de doenças, ausência de restrições religiosas, baixo custo, baixo peso molecular, biocompatibilidade, rápida absorção no corpo humano (BLACKSTONE; GALLENTINE; POWELL, 2021).

Um ensaio de raspagem *in vitro* da pele da Tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)* averigou que seu colágeno é capaz de melhorar o processo de cicatrização de feridas com aplicações promissoras (HU *et al*., 2017). Visando a valorização do uso do colágeno aquático, uma pesquisa comprovou que a pele da Tilápia do Nilo apresenta características microscópicas semelhantes às estruturas morfológicas da pele humana, com elevada resistência à tração, suportando assim a possível aplicação como biomaterial (ALVES *et al*., 2015). Além disso, um estudo não só constatou a presença rica fonte de colágeno na pele de Tilápia do Nilo, mas também ratificaram o seu uso como curativo oclusivo para feridas (VERDE *et al*., 2021).

Os filmes de colágeno proveniente de pele de peixe ocupam espaço como um novo biomaterial devido à fartura da proteína e boa aplicabilidade, sendo assim, pesquisadores avaliaram o comportamento mecânico dos filmes as diferentes condições ambientais de hidratação, submersão de temperatura fisiológica e resistência à tração. Simultaneamente sob os três fatores, foi possível observar a queda da resistência à tração do filme de colágeno em cerca de 90% em comparação com as amostras secas, enquanto a deformação aumentou para cerca de 145%. Apesar do filme de colágeno apresentar sensibilidade à taxa de deformação, notou-se a não alteração para as fibrilas do colágeno presente no filme (BOSE *et al*., 2020).

Evidências científicas comprovam que os filmes de colágeno também podem ser usados como nanogeradores piezoelétricos com a capacidade de atuar como um sensor para captar os

sinais fisiológicos do corpo humano, sendo isso possível devido à flexibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e comportamento piezoelétrico (GHOSH; MANDAL, 2017).

Os organismos marinhos vêm sendo considerados como fontes promissoras de colágeno despertando assim o interessse da indústria ao longo dos anos devido às propriedades terapêuticas, farmacêuticas, biomédicas (COPOLLA *et* a*l*., 2020). Os peixes tornam-se uma peça fundamental de estudo devido à perspectiva de descoberta de novas fontes biológicas de valor comercial que possuam gestão sustentável de recursos naturais, assim gerando valor adicional para as empresas envolvidas no campo da bioprospecção (CARUSO *et al*., 2020).

Nesse sentido, é revelante destacar que a Região Amazônica possui a maior riqueza de organismos de água doce do mundo, os registros sobre a distribuição espacial de peixes na Bacia Amazônica apontam a presença de 2.406 espécies nativas de água doce, além de 232.936 registros georreferenciados (BORGHEZAN *et al*., 2020). Apesar da abundância, autores ainda notam a carência de mais estudos sobre a região e a fauna aquática (JÉZÉQUEL *et al*., 2020).

Uma análise de bioprospecção e o emprego de microalgas como suplementos alimentares provenientes da Região Amazônica, não só notou inúmeros benefícios de aplicação, mas também lacunas de conhecimento que dificultam a devida exploração biotecnológica e econômica. A carência técnico-científica foi identificada principalmente no âmbito regional, sendo a capacidade desses microrganismos bem explorados na área internacional, porém, não na região Amazônica. Sendo assim, o potencial biotecnológico ainda permanece dependente de etapas fundamentais como: identificação das espécies, entendimento de respectivas funções, aplicabilidade na área biotencólogica e na agricultura (JÚNIOR SILVEIRA; FAUSTINO; CUNHA, 2019).

Nesse sentido, os peixes são considerados como uma grande fonte de colágeno, em especial *Oreochromis niloticus*, sendo a comprovada eficácia em diversos estudos na regeneração tecidual. No entanto, é possível observar a carência de pesquisas sobre o colágeno dos peixes da Bacia Amazônica, apesar de apresentar uma enorme biodiversidade e uma vasta

fauna. Sabendo que os filmes de colágeno provenientes de pele de peixe possuem potencial de aplicação na área biomédica, será realizado um estudo comparativo entre os filmes de colágeno da Tilápia do Nilo e os peixes amazônicos denominados de Acará-severo e Tucunaré-açu. Essa pesquisa é relevante por buscar novos meios de cicatrização de feridas, além de trazer novas alternativas comerciais, perspectivas de biomateriais, fontes biológicas para agregar valores à comunidade científica e empresas no campo de bioprospecção.

2. OBEJTIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo comparativo para avaliar os filmes de colágenos originários das peles dos peixes *Cichla temensis* e *Heros severus* em relação ao *Oreochromis niloticus*.

2.2 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir filmes por meio de colágeno de peixe (Colágeno + PVA) pela técnica de evaporação de solventes.
- Comparar os filmes de colágeno proveniente da pele de Tilapia e de peixes da Região Amazônica (Tucunaré - açu e Acará-severo).
- Investigar características morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar se esses filmes possuem propriedades mecânicas de tração aproximadas.
- Depositar fios pela técnica de *electrospinning* em filme selecionado.
- Avaliar a capacidade de bioprospecção da investigação
- Averiguar a aplicabilidade dos filmes de colágeno na engenharia tecidual, com ênfase na área odontológica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COLÁGENOS DISPONÍVEIS NOS TECIDOS

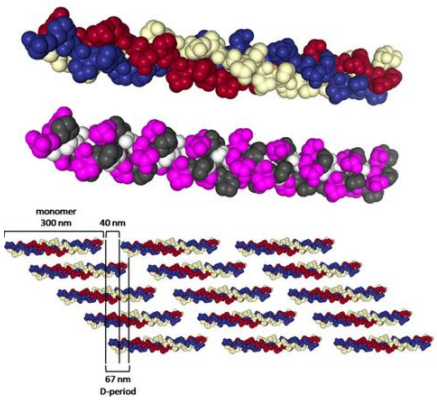
Sendo um elemento estrutural, componente proteico da sustância intercelular do tecido conjuntivo, o colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos e é encontrado em tendões, ligamentos, ossos, pele, vasos sanguíneos intestinos, discos intervertebrais, dentina dos dentes, córnea, placenta entre outros (GULEVSKY; SHCHENIAVSKY, 2020).

Vale ressaltar que entre o genoma dos animais vertebrados e invertebrados é possível encontrar 28 tipos de colágenos distintos, sendo esses nomeados por meio de algarismos romanos (I a XXVIII) e classificados de acordo com a estrutura do domínio e organização supraestrutura (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014).

O colágeno é aquele que contém uma estrutura Gly-X-Y repetidos que tendem a ter uma estrutura helicoidal tripla única. Os colágenos homotriméricas consistem em três cadeias idênticas como Tipo II e III, enquanto os outros são heterotrímetros com diferentes cadeias, como o Tipo I que possui duas cadeias α1(I) e uma cadeia α2(I). Além disso, essas proteínas também são classificadas em subfamílias com base em estruturas supramoleculares, como Colágenos formadores de fibrilas (Tipo I, II, III,V e XI), Colágenos formadores de rede (Tipo IV, VIII e X), Colágenos associados a fibrilas com hélices triplas interrompidas (FACIT, Tipo IX, XII,XIV,XVI e XIX), Colágenos de Transmembrana (Tipo XIII e XVII) e outros tipos de colágenos (KOIDE; NAGATA, 2005).

Com a estrutura hierárquica complexa e organizada, o colágeno é gerado por fibroblastos intracelularmente, com uma estrutura helicoidal tripla. Vale ressaltar que essa proteína é composta por cadeias que possuem aproximadamente 1000 aminoácidos cada uma, sendo formadas por conexão equivalente a sequências repetidas de três aminoácidos Gly-X-Y, que correspondem respectivamente a Glicina, Prolina ou Hidroxidoprolina (SHOULDERS; RAINES, 2009) (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Estrutura do Colágeno Tipo 1 em 2 modelos coloridos de tripla hélice com 300nm de comprimento. É possível observar a composição de aminoácidos sendo a glicina (Gy) em branco, a prolina (X) cinza e a hidroxiprolina (Y) em roxo.



Fonte: Salvatore *et al*, 2020.

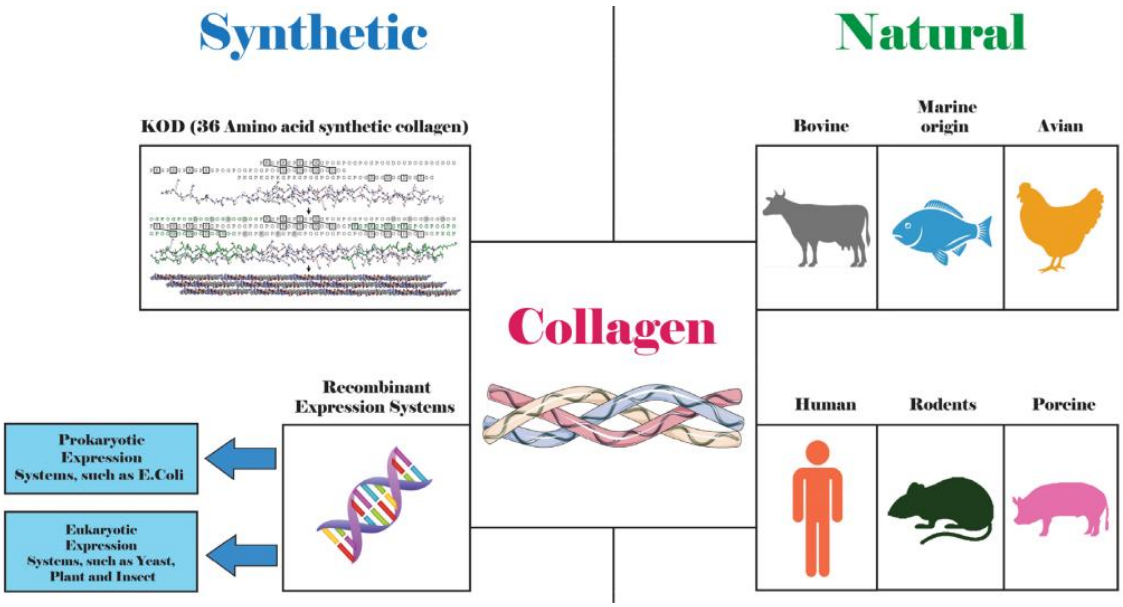
É importante destacar que essa proteína tem chamado atenção para a engenharia de tecidos; uma vez que não apenas contém o suporte mecânico, mas também fornece suporte físico para as células influenciando-as durante fixação, crescimento e regeneração. O Colágeno Tipo I é caracterizado como padrão ouro devido a alta biocompatibilidade, biodegrabilidade e propriedades homeostáticas. (TERZI *et al*.,2020).

O colágeno tipo I é a mais abundante proteína da matriz em mamíferos, atuando no suporte estrutural para osso, pele, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos e também a para fatores extracelulares que regulam processos fisiológicos, incluindo adesão celular, proliferação e diferenciação (ANTOINE; VLACHOS; RYLANDER, 2014).

3.2. FONTES DE COLÁGENO

O colágeno empregado na indústria apresenta diversas fontes, sendo essas derivadas de animais mamíferos - cavalo, bovino, aviário, suína – ou de animais marinhos - peixes, tubarões, águas-vivas, estrela do mar, algas -. Vale ressaltar que o colágeno humano também pode ser recombinado com bactérias e vegetais (MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021) (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Fontes de colágeno.



Fonte: Rezvani Ghomi *et al*, 2021.

Para a utilização de estudos com eletrospninig o colágeno bovino lidera o ranking com 28%; seguido do bezerro com 30%; outras fontes não relatadas 16%; rato 13%; porco, peixe, galinha com 3%; humano 2% (BLACKSTONE; GALLENTINE; POWELL, 2021).

Grandes mamíferos terrestres como – vacas, porco, ovelhas e cavalos – são amplamente utilizadas para extração de colágeno (GALLO *et al*., 2020). Apesar disso, pesquisas apontam que o colágeno derivado de peixes, águas-vivas, esponja e moluscos representam fontes mais seguras e atrativas para uso (SALVATORE *et al*., 2020).

3.3. VANTAGENS DO COLÁGENO DERIVADO DE ANIMAIS AQUÁTICO EM RELAÇÃO AOS TERRESTRES

A noção de desenvolvimento sustentável tornou-se um dos principais tópicos nos programas de economia verde, propondo alternativas ecológicas de exploração de recursos naturais; por conseguinte a Comissão Europeia já aprovou a estratégia de "*Blue Growth*" que visa apoiar o crescimento sustentável dos setores marinhos e marítimos. Nesse sentido, a comunidade científica vem corroborando resultados positivos e as aplicações do colágeno derivado de animais aquáticos, que apresentam as propriedades: baixo custo; sem risco de transmissão de doenças; ausência de restrições religiosas; biocompatibilidade; fácil absorção no corpo humano (JAFARI *et al*., 2020).

Diferentemente do exposto acima, o colágeno derivado de animais terrestres contém limitações de alto custo para produção, restrições religiosas e risco de transmissão de doenças (XU *et al*., 2021). Jin *et al* (2019) afirma que essa proteína derivada de animais bovinos gera preocupação devido à eventuais surtos de encefalopatia espongiforme, encefalopatia espongiforme infecciosa e febre aftosa.

Kirsner *et al* (2020) comprova em pesquisa que o enxerto derivado de pele de peixe apresenta superioridade em relação a cicatrização de feridas crônicas, quando comparado com o aloenxerto de membrana amnion/córion desidratada. Posto isto, é possível ratificar as vantagens derivadas de animais aquáticos sobre os animais terrestres.

3.4. APLICABILIDADE DO COLÁGENO NA INDÚSTRIA

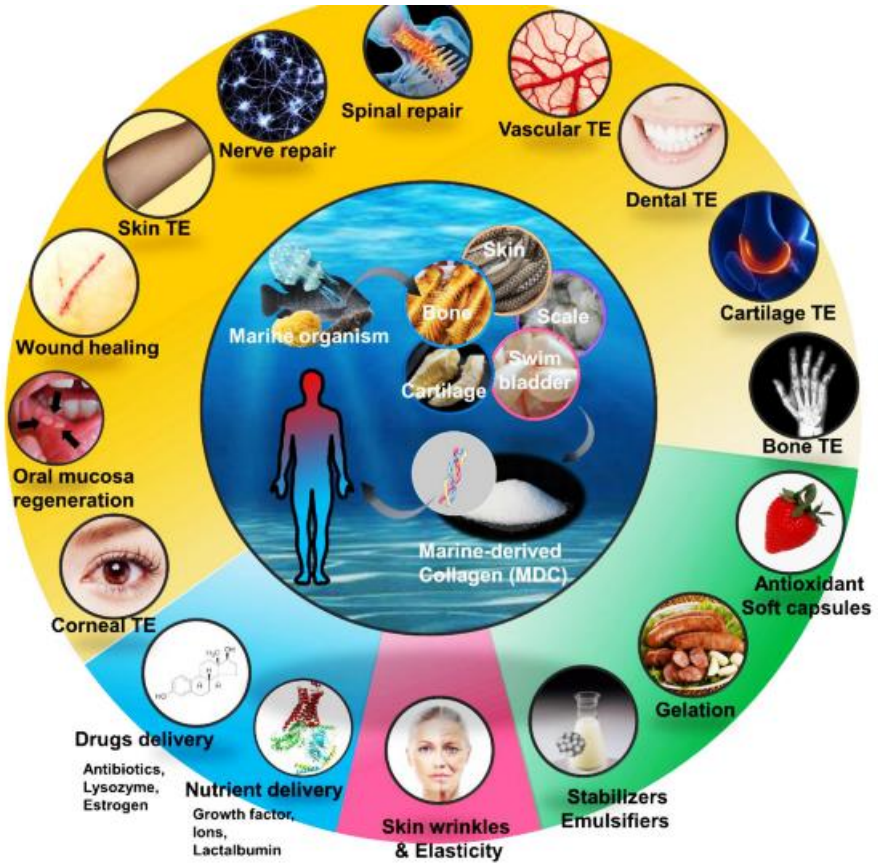
O colágeno é a matriz extracelular mais abundante do reino animal, pertencendo à família de proteína fibrosa, transferindo carga nos tecidos e fornecendo um ambiente compatível para células. A propriedade de biocompatibilidade proporciona alta aplicabilidade no meio industrial para produção de materiais como: esponjas porosas, membranas, fios cirúrgicos e odontológicos (MEYER, 2019).

Somado a isso, essa proteína vem apresentando aprimoramento físico-químico com as seguintes características: estabilidade, resistência mecânica, biocompatibilidade e

biodegradabilidade. Seu uso é estendido à engenharia de tecidual nos respectivos tegumentos: cardíaco, dental, periodontal, vascular, ósseo, córnea, pele e cartilagem (SUBHAN *et al*., 2021) (Figura 3.3).

O colágeno também é utilizado em suplementos alimentares e nutracêutrico, direcionados para o controle de peso e glicêmico, sendo os filmes das proteínas capazes de encapsular drogas protegendo o alimento da desidratação, luz e oxigênio. Além disso, o colágeno também pode ser usado como estabilizador de alimentos, antimicrobiano e antilipoxidante (SALVATORE *et al*., 2020). Seu processamento ocorre de diversas maneiras, sendo essas: sólidas (filmes, folhas, membranas, esponjas, discos, tubos, micro/nanopartículas, fibras) ou injetáveis (géis, solução aquosa ou dispersão) (ZHU *et al*., 2018).

Figura 3.3- Aplicabilidade do colágeno na indústria



Fonte: XU Ning et al, 2021

Vale ressaltar que o colágeno pode contribuir para a redução da poluição plástica por meio da produção de embalagens ecológicas à base de biopolímeros, sendo esses fabricados a partir de filmes biodegradáveis. Isso só é possível devido ao processamento dessa proteína derivada de animais terrestres e aquáticos (ASSAD *et al*., 2020).

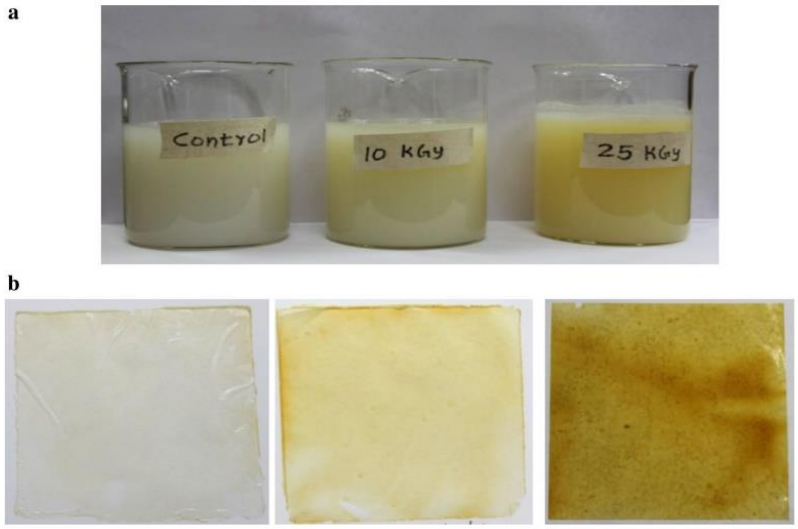
3.5. APLICABILIDADE DOS FILMES DE COLÁGENO

Os filmes de colágeno são usados na engenharia de tecidos, tratamento de feridas, substituto dural e em equipamentos eletrônicos flexíveis (BOSE *et al*., 2020). Os filmes podem apresentar a seguintes características: efeitos imunogênicos, moduláveis em até 6-24 meses, esterilizáveis através de radiação gama ou óxido de etileno e sintonizáveis por meio de reticulação ou nanofibra. Esses resultados são significativos para engenharia de tecidos (BONFERONI *et al*., 2021).

Um estudo observou que o filme de gelatina tem a capacidade de aplicação biomédica. Nesse sentido, os autores combinaram os filmes com células-tronco para acelerar ainda mais a regeneração da pele e os modificaram com polissacarídeos para melhorar a atividade biológica. O filme de gelatina ácido-hialurônico obteve maior estabilidade, maior segurança biológica, suportou maior a adesão e crescimento do cordão umbilical humano células-tronco mesenquimais derivadas de geléia de Wharton, maior segurança biológica quando comparado com o filme de gelatina – quitosana (LIU *et al*., 2020).

Uma pesquisa de filmes usando dispersão da proteína de resíduos de peixe com radiação gama, averigou vasta aplicabilidade em embalagens de alimentos na indústria. A investigação chegou à conclusão de que, se tratado com 10 kGy, o filme pode ser usado como embalagem ou como revestimento (se for usada dispersão) de alimentos devido às melhores propriedades indústriais (Figura 3.4) (MISHRA *et al*., 2021).

Figura 3.4 - Soluções formadoras dos filmes (a). Filmes resultantes formados após o processamento. Sendo o filme controle tratado com 10kGy, e os outros tratados com 25kGy respectivamente (b).



Fonte: Mishra *et al*, 2021

3.6. A CORRELAÇÃO DO FILME DE COLÁGENO E A TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING*

Sabe-se que o colágeno na forma desnaturada é um biopolímero importante para engenharia tecidual, alimentação, cosméticos (PORTIER *et al*., 2017). Por conseguinte, o filme de colágeno derivado da pele de peixe apresenta a característica de não toxicidade, alta porosidade, boas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (YUJING *et al*., 2021).

A técnica de *electrospinning* baseia-se na criação de um campo eletrostático de alta voltagem que faz a solução polimérica superar a própria tensão superficial viscoelástica, acompanhando então a volatização, resfriamento e solidificação do solvente. A partir disso, fibras são formadas e depositadas na placa coletora, acumulando-se criando um filme (DUAN *et al*., 2022).

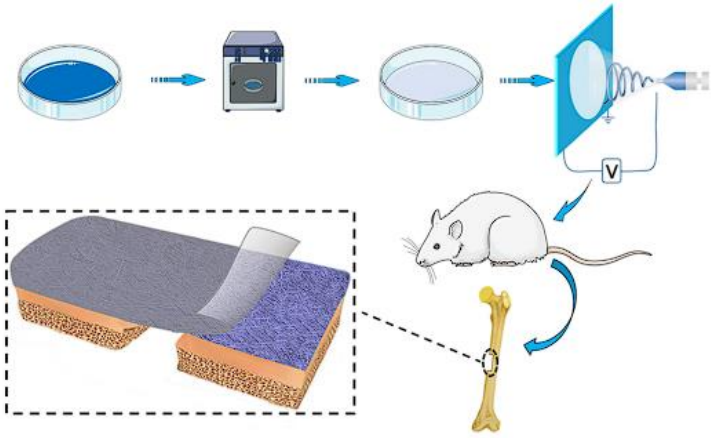
Por meio de polímeros a técnica de *electrospinning/electrospun* produz fibras (diâmetro micro e nanômetro) semelhantes a arquitetura fibrosa da matriz extracelular. Esse método também proporciona: superfície com moléculas bioativas, invasão e proliferação celular em construções tridimensionais, incorporação de fatores de crescimento e resistência ao estresse mecânico (RATNER *et al*., 2004).

Uma investigação utilizou gelatina de pele suína e colágena extraído de cauda de rato na preparação de soluções com intuito empregar na técnica de *electrospinning*. Os pesquisadores aperfeiçoaram os parâmetros de polímero e eletrofiação, criando assim uma estrutura com espessura, alinhamento e tamanho de poro desejado. Além disso, foi observada a incorporação de células durante o processo de electrospinnig (NOSOUDI *et al*., 2020).

Pesquisas afirmam que a técnica de *electrospinning* foi capaz produzir membranas de nanofibra 3D, às quais tinham a capacidade de acomodar a adesão, proliferação e expansão celular (QIAN *et al*., 2016). Corroborando a literatura, cientistas produziram um polímero revestido de colágeno otimizado com produtos antimicrobianos e propriedades osteogênicas, sendo esses submetido a técnica de eletrofiação. O resultado do estudo gerou um produto final com uma matriz funcional que não só evitou infecção, mas também melhorou a mineralização óssea (QUIAN *et al*., 2019).

Zhang *et al* (2021) preparou uma solução que foi transformada em filme por meio da técnica de *electrospinning*, que continham os seguintes produtos: Colágeno mineralizado(MC), Quitosana(CS), Barberina (BER - ervas chinesas), policaprolactona (PCL) polivinilpirrolidona (PVP). Sendo assim, originou-se uma membrana com bicamada (BER@PCL/PVP-MC/CS) a qual foi aplicada no defeito ósseo femoral de ratos. Os autores chegaram à conclusão que essa membrana apresentou boa bioatividade, características mecânicas favoráveis. Foi observado também que as nanofibras eletrofiadas apresentavam uma estrutura semelhante à matriz extracelular que induziu a fixação e proliferação de osteoblastos no estudo *in vitro* (Figura 3.5). Sendo assim, nota-se a otimização da formação de filmes de colágeno quando aplicado à técnica de electrospinnig.

Figura 3.5 – Esquema ilustrando a prepararação de uma membrana com bilaminar aplicada em ferimentos de ratos, a mesma foi produzida nos seguintes elementos: Colágeno mineralizado (MC), Quitosana (CS), Barberina (BER - ervas chinesas), policaprolactona (PCL)/polivinilpirrolidona (PVP).



Fonte: Zhang Yuhan *et al*, 2021

3.7. APLICABILIDADE DO FILME COLÁGENO DERIVADO DE PEIXE NA ODONTOLOGIA

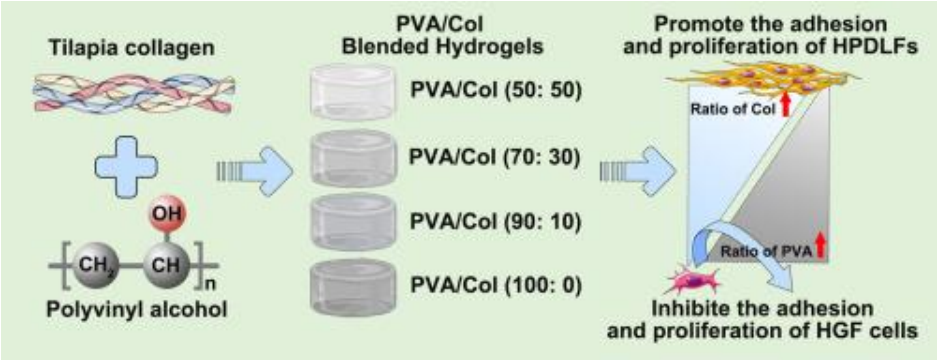
É comprovado que a proteína é capaz de promover a regeneração tecidual periodontal em recessões gengivais através de um método lento ou rápido, dependendo da técnica utilizada, sem sinal de toxicidade ou efeito adverso (NAOMI *et al*., 2020).

Estudos constatam que as escamas do peixe *Osphronemus gourami* possuem a capacidade de elevar a expressão osteoprogenitora e os níveis dos ativadores de receptores do fator nuclear kappa-B ligante, sendo essa descoberta interessante para tratar doenças periodontais que necessitam de enxerto ósseo (WIJAKSANA *et al*., 2021).

Um ensaio *in vitro* avaliou a capacidade da criação de uma membrana produzida a partir de hidrogéis de alcóol povilínico (PVA) misturado com colágeno (Col) proveniente de peixe (Tilápia do Nilo), com a intenção de realizar a regeneração tecidual guiada (RTG) para o tratamento de periodontite. A pesquisa preliminar evidenciou que a mistura do PVA e Col

aumentou a porosidade, a concentração da proteína Col, a adesão e proliferação de fibroblastos no ligamento periodontal e fibroblastos da gengiva. O estudo comprovou que essa fusão de PVA/Col é capaz de regular o comportamento celular, provando-se como fontes potenciais para o desenvolvimento de membrana de RTG (Figura 3.6) (ZHOU *et al*., 2020).

Figura 3.6 - Membrana produzida a partir de hidrogéis de alcóol povilínico (PVA) misturado com colágeno (Col) proveniente de pele de Tilápia do Nilo promevendo a adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal e da gengiva.



Fonte: Zhou Tian *et al*, 2020.

Pesquisadores realizaram um experimento in vitro e comparativo entre membranas de colágenos presentes no mercado e filmes de goma gel/gelatina derivadas de pele de atum, com a finalidade de avaliar a eficácia desses produtos para regeneração óssea guiada (ROG). Por conseguinte, defeitos ósseos experimentais foram preparados em calvária de coelho, preenchidos com enxerto ósseo de fosfato-beta-tricálcico. Posto isso, o filme de colágeno foi usado como membrana de ROG e comparado com as membranas de colágeno comerciais. O resultado da pesquisa demonstrou que o filme não colapsou no defeito ósseo e o material enxertado não apresentou dispersão. Dessa maneira os autores sugerem que os filmes de colágeno podem ser usados como membrana para ROG (JUNG *et al*., 2020).

3.8. BIODIVERSIDADES AQUÁTICAS DA AMAZÔNIA E SEUS POTENCIAIS PARA NOVAS DESCOBERTAS

A bacia amazônica cobre mais de 6.000.000 km^2, produz cerca de 16% da descarga de água doce do mundo (LATRUBESSE *et al*., 2017), contendo a maior biodiversidade de água

doce na Terra, que vem sofrendo aumento de ameaças antropogênicas. Sabe-se que o conhecimento da distribuição espacial de peixes de água doce nessa bacia é limitado, dificultando a compreensão da hiper-diversidade do ecossistema (JÉZÉQUEL *et al*., 2020).

Em uma investigação sobre a diversidade e a distribuição geográfica dos peixes amazônicos, foi possível notar a presença de 4.214 espécies (tanto amazônicas como de bacias vizinhas). Na arguição que compreendeu especificadamente a Bacia Amazõnica, observou-se a presença de 2716 espécies, sendo 1696 endêmicas, com 529 gêneros, 60 famílias e 18 ordens de peixes de água doce (DAGOSTA; PINNA, 2019).

Vale ressaltar que nessa bacia hidrográfica há a presença de peixes não nativos, essa situação pode ameçar o ecossistema aquático do planeta. O estudo de DORIA *et al* (2021), averigou deficiência de informação desses dados em relação a Região Amazônica. A pesquisa avalivou por bacia hidrográfica e por país, incluindo assim 6 países, Brasil, Peru, Bolívia, Equador, Venezuela e Colômbia, os quais compreendem juntos mais de 80% da Região Amazônica. Posto isto, constatou-se a presença de 1314 registros referentes aos peixes não nativos, incluindo 9 ordens, 17 famílias e 41 espécies. Os peixes mais dectados foram *Arapaima gigas*, *Poecilia reticulata* e *Oreochromis niloticus*. O estudo enfatiza a precariedade em relação à informação sobre os peixes não nativos, os seus impactos negativos e a deficência de estratégias de manejo, implicando assim em uma ameaça à população nativa de peixes da Amazõnia.

Os estudos científicos atuais ratificam que o colágeno derivado do osso, da escama e da pele de peixe é uma boa alternativa para superar as limitações do colágeno mamífero (KULKARNI; MANIYAR, 2020). Logo, devido à diversidade da Bacia Amazônica em relação à população de peixes representados nos dados acima, é interessante destacar a região como um polo para descobertas e pesquisas científicas de novas fontes de colágeno.

3.9. CARACTERÍSTICAS DA TILÁPIA DO NILO (O*reochromis niloticus*)

O peixe tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é pertencente à família dos ciclídeos, originário da bacia do rio Nilo, no Leste da África, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais (CARVALHO, 2006). Por intermédio do Departamento

Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), em 1971, a espécie foi introduzida nos açudes do Nordeste do Brasil, difundindo-se para o resto do país (FIGUEIREDO; VALENTE, 2008).

Morfologicamente o couro da Tilápia do Nilo apresenta um desenho de flor com lamélulas de proteção e inserção das escamas com maior definição em tamanho e comprimento que é o tecido dérmico que sobrepõe à porção anterior da escama. Histológicamente a pele da Tilápia é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Na epiderme há um tecido epitelial pavimentoso estratificado, com subcamadas de células epiteliais, sendo que a camada germinativa contém células cilíndricas com núcleo oval apoiadas em uma membrana basal nítida. A derme é composta por duas camadas uma superficial (abaixo da epiderme) e uma mais profunda, sendo que nessa camada a Tilápia apresentou feixes de fibras colágenas finos, sobrepostos e cruzados no sentido transversal à superfície da pele. Já no tecido conjuntivo froux, foi observada a presença de melanóforos, células que sintetizam melanina. A composição a tilápia apresentou um alto valor de lipídeos, fibras colágenas, proteínas brutas e quantidades graxas (FRANCO *et al*., 2013).

Uma análise microscópica da pele de Tilápia pode observar uma epiderme revestida com epitélio pavimentoso estratificado, constituído por poucas camadas celulares, as suas células basais apresentavam uma morfologia colunar e as espinhosas poligonais de núcleos ovais. A derme superficial era composta por tecido conjuntivo frouxo, permeados por vasos sanguíneos com calibres variados, com fibras colágenas paralelas e finas, apresentando melanóforos subepiteliais e melanogafos dispersos. A derme profunda apresentou fibras colágenas organizadas, compactadas. Na hipoderme havia a presença de acúmulos de adipócitos típicos e feixes nervosos (ALVES *et al*., 2015).

Um fator interessante da pele de Tilápia é apresentar uma excelente quantidade de colágeno Tipo I, sendo que esse apresenta biocompatibilidade comparável com a pele suína, indicando uma alternativa potencial ao colágeno Tipo I de mamíferos na aplicação também de regeneração na área oral-maxilofacial (TANG; SAITO, 2015).

Ademais o estudo de Lima Júnior (2017) comprovou que os feixes de colágeno da pele da tilápia são densos e dispostos de maneira paralela/transversal, diferentemente da organização da derme humana a qual apresenta fibras com aumentada atividade colagênica em diversas direções. Os autores a princípio suspeitaram que esse aspecto fizesse com que a pele humana

possui uma maior capacidade de resistir à grandes cargas, no entanto, no teste de extensão à tração, as médias entre pele humana/pele tilapia demonstram-se semelhantes (média tilápia = 4,442 cm; média humana = 4,615 cm).

O colágeno de tilápia induz significativamente a expressão do fator de crescimento epidérmico e do fator de crescimento de fibroblastos, que pode promover a proliferação e diferenciação de fibroblastos e queratinócitos (CHEN *et al*., 2019). O trabalho de Lima Júnior *et al* (2021), observou que a pele de tilápia do Nilo quando aderida ao leito da ferida, pode agir como um xenoenxerto flexível e estável, sem antigenicidade e toxicidade, promovendo a permeabilidade à água e retenção de calor, além de funcionar como uma barreira para microorganismos.

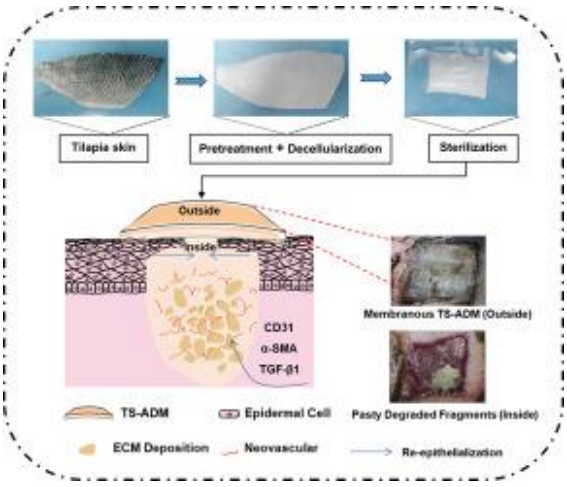
Pesquisas científicas avaliaram a capacidade do colágeno derivado da pele de tilápia do Nilo para melhorar a cicatrização de feridas cutâneas em ratos e investigar os possíveis mecanismos subjacentes. Dessa maneira, feridas cirúrgicas foram conduzidas nas costas de ratos sob anestesia geral para aplicação do extrato de colágeno de Tilápia na área. A ferida foi observada em seus estágios de cicatrização por meio de exames: histopatológicos; expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento transformador (TGF-ß1); imunohistoquímica; fator de crescimento transformador beta (TGF-ß1); fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e actina de músculo liso alfa (α-SMA). A avaliação histopatológica mostrou sinais perceptíveis de cicatrização da pele, já os resultados da imunohistoquímica revelaram notável aumento nos níveis de expressão de VEGF e TGF-β1. Esses resultados permitem a conclusão que o extrato de colágeno de Tilápia do Niolo promove o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, com ativação de macrófagos, com proliferação de fibroblastos e angiogênese (ELBIALY *et al*., 2020).

Já foi possível a utilização de um biomaterial proveninente da pele de peixe de Tilápia do Nilo como xenoenxerto para três procedimento de neovaginoplastias em casos de síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser. Os resultados foram promissores, visto que o estudo descritivo demostrou que o enxerto permitiu uma neovagina anatômica e funcional. Ademais, as análises histológicas e imunohistoquímicas revelaram a presença de epitélio escamoso estratificado com alta expressão de citoqueratinas e fator de crescimento de fibroblastos, condizente com as características do tecido vaginal adulto normal, comprovando assim, a eficácia do xenoenxerto (DIAS *et al*., 2020).

Ademais o estudo in vitro de investigou a funcionalidade de um novo Colágeno de Tilápia Hidrolisado (HFC) para regeneração de tecido periodontal. Sendo assim, o HFC era extraído das escamas de Tilápia e a células do ligamento periodontal eram cultivadas. Foi observado com o tempo que, o HFC promoveu a viabilidade de células no ligamento periodontal humano com os marcadores positivos osteogênicos, além da produção de proteínas osteogênicas relacionadas ao sucesso da diferenciação osteogênica (fosfatase alcalina e osteocalcina). Dessa forma, os autores chegaram à conclusão que o Colágeno de Tilápia Hidrolisado permitiu a viabilidade celular, expressão osteogênica dos genes relacionados, produção de proteínas, provando-se com um bom candidato aditivo para biomateriais (CHAO LIU; JIAO SUN, 2015).

A matriz dérmica acelular (ADM) é feita principalmente com pele humana ou suína e apresenta o risco de transmissão do vírus zoonótico; entretanto, sabe-se que a pele acelular do peixe Tilápia (TS-ADM) pode superar essa deficiência. Nesse sentido, um experimento de cicatrização de feridas em pele de rato e mini-porco, retificou, por meio de uma análise histopatológica, que em comparação com a matriz dérmica acelular suína comercial (DC-ADM), o TS-ADM mostrou promover significativamente o crescimento de granulação, deposição de colágeno, angiogênese e reepitelização (Figura 3.7). Foi comprovado que o TS-ADM usado como um curativo bioativo de baixo custo poderia formar um microambiente propício à cicatrização de feridas (LI *et al*., 2021).

Figura 3.7 - Preparação da pele de tilápia, preparação, fabricação da matriz dérmica acelular de pele da tilápia. Aplicação na ferida cirúrgica em ratos. Evolução da cicatrização.



Fonte: LI, Dongsheng *et al.*, 2021

3.10. CARACTERÍSTICAS DO ACARÁ-SEVERO (*Heros severus*)

O Acará - severo (*Heros severus*) é classificado como um peixe ornamental, da família dos ciclídeos, com boa adaptação ao cativeiro. Vale ressaltar que essa espécie apresenta exuberância e coloração de seus exemplares (CAMPELO *et al*., 2019).

Essa espécie apresenta comprimento máximo de 20 cm e com distribuição pela América do Sul: Bacia do Rio Orinoco alto; drenagem do Rio Orinoco na Colômbia e Venezuela; Amazonas na Bacia do alto Rio Negro. Os países em que esse peixe pode ser encontrado são: Brasil, Colômbia e Venezuela (STAECK; SCHINDLER, 2015).

Segundo Kuallander (1986), o *Heros severus* é uma espécie muito mais esbelta, tem uma mancha caudal distinta, apresenta uma vertical distinta em barras, exceto em alguns espécimes grandes em que todos se desvanecem. O 6º compasso de H. severus geralmente não chega tão longe dorsalmente quanto à barbatana dorsal.

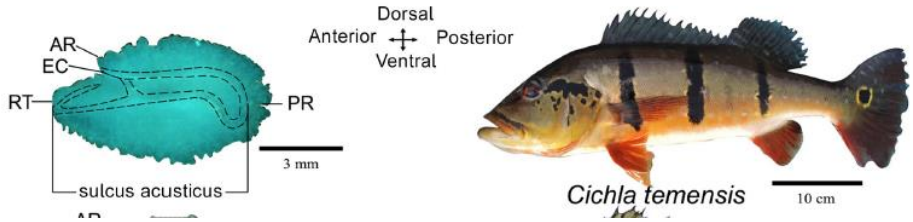
Estudos em relação à aplicação da pele do Acará-severo na engenharia de tecidos, biomédicas, industriais não foram encontrados durante a pesquisa da revisão bibliográfica.

3.11. CARACTERÍSTICAS DO TUCUNARÉ - AÇU (*Cichla temensis*)

Um peixe notável para pesca comercial, subsistência da população local e preferida dos pescadores esportivos, o tucunaré - açu caracteriza-se como uma espécie importante na Bacia Amazônica, sendo encontrada na região do rio Negro (CAMPOS; CATARINO; FREITAS, 2019). O *Cichla temensis* também está presente na drenagem do rio Orinoco (Colômbia e Venezuela) e nos rios de águas pretas ao longo do Rio Solimões Amazonas (KULLANDER; FERREIRA, 2006).

O gênero *Cichla* apresenta 16 espécies descritas na literatura e apesar das similaridades é possível diferenciar as espécies. Nessa linha de raciocínio, autores notaram que *C. temensis* apresenta, em sua forma, elipcidade e circularidade, enquanto *C. monoculus* e *C. orinocensis* contém retangularidade e arredondamento (Figura 3.8) (MERELES *et al*., 2021).

Figura 3.8 - Anatomia do Tucunaré –açu.



Fonte: Mereles, Marcos A *et al*., 2021

O *Cichla temensis* tem aproximadamente 46cm de comprimento (KULLANDER, 1986) com tonalidade predominantemente amarela, interrompida por barras escuras ao longo do corpo, vale ressaltar que o Tucunaré-açu pode apresentar variações no padrão de cores devido a uma característica sexual secundária, sinalizadora do grau de maturação sexual sazonal (REISS *et al*., 2012). Autores revelam que a pigmentação da espécie pode sofrer alterações de acordo com as condições do nível da água (REISS; GROTHUES, 2015).

Em relação ao estudo com filmes de colágeno, foi observado carência sobre o assunto em relação a essa espécie, corroborando assim a necessidade de realização de experimentos para novas descobertas no campo da biotecnologia.

4. METODOLOGIA

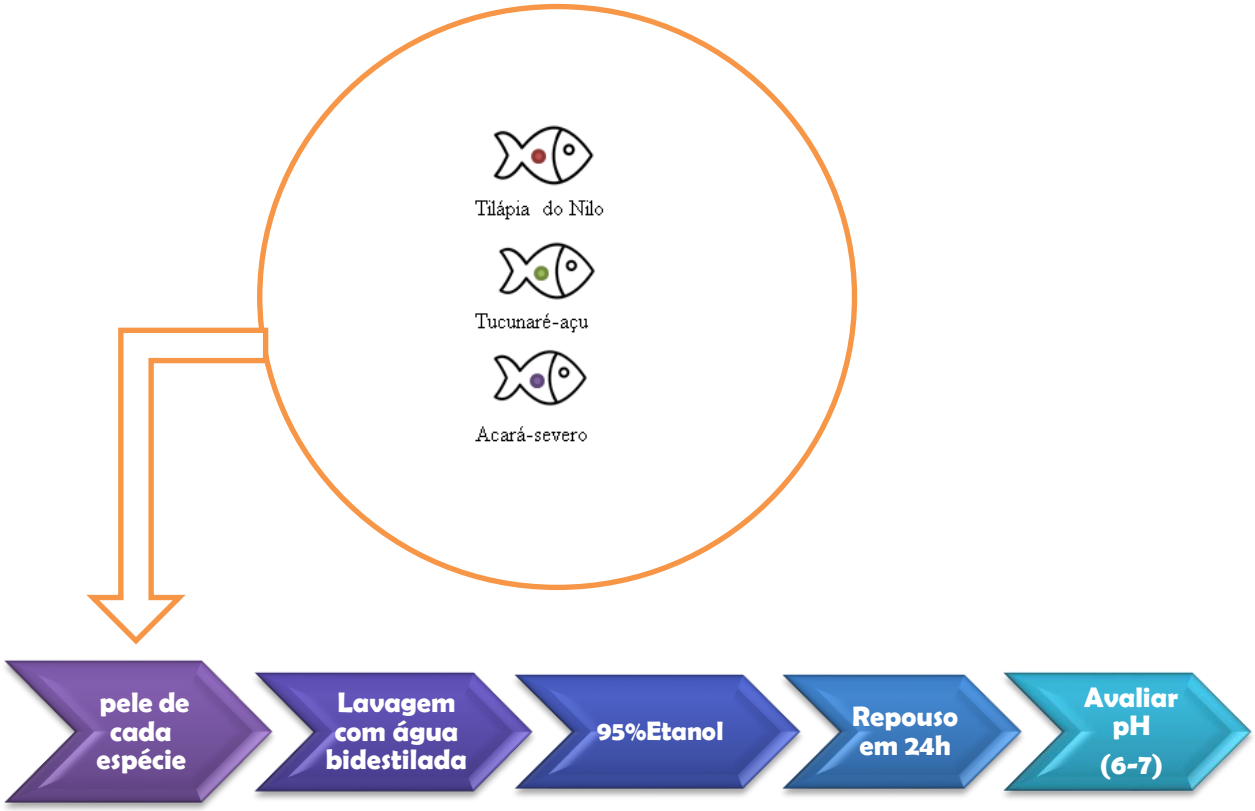
O presente estudo agregou várias áreas e subáreas do conhecimento como: Ciência Biológica – Ciência da Saúde – Engenharia III, com finalidade de produzir e comparar filmes de colágeno derivados da pele de peixes da Tilápia do Nilo, Tucunaré-açu e Acará – severo. As suas respectivas elaborações ocorreram por meio de soluções de Colágeno + PVA, por meio do método de evaporação de solvente.

Provenientes de piscicultura (Estrela d'água – Castanhal/PA e Viva Esperança-Capanema/PA) os peixes foram selecionados, sendo da espécie *Oreochromis niloticus*, *Heros severus*, *Cichla temensis.* Vale ressaltar que os peixes foram congelados e transportados em um

recipiente gélido a -15ºC para conservação de todas suas estruturas e ficaram armazenados em *freezer* a uma temperatura de -15ºC até a realização do experimento (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Riispoa), de 1952, sob o artigo 439 e parágrafo 3º).

Para o prosseguimento da pesquisa os peixes foram descongelados a temperatura/umidade ambiente, as suas peles foram seccionadas, lavadas com água bidestilada por 10 minutos e misturadas com etanol 95% sem agitação durante 24h, com o objetivo de remover produtos não colagenosos, gordura e outros resíduos (Figura 4.1). Vale ressaltar que o teste do tempo de contato foi realizado em 24 horas, havendo também a verificação do pH das soluções de Tilápia (X), Tucunaré-açu (Y) e Acará-severo (Z).

Figura 4.1 – Fluxograma do processo de extração do colágeno da pele de peixe.



Fonte: Próprio autor

Após isso, as amostras foram lavadas 3 vezes com água destilada, colocadas em tubos de ensaio com água bidestilada, centrifugadas por 20 minutos em 3000 rpm e levemente

secadas. A extração do colágeno ocorreu mediante o método de hidróxido de sódio: 1000 mL de NaOH 0,12M por 12h à temperatura ambiente, sendo posteriormente, filtradas. As amostras X, Y e Z foram dialisadas. Para tanto, o colágeno diluído foi submerso em uma solução de ácido acético (CH3COOH) 0,1 M por 08 h a 25ºC / 1:9 (v/v). Lavagens com água destilada, foram realizadas até o colágeno ficar com pH entre 6-7, obtendo-se após essa etapa o colágeno dialisado e um sétimo efluente. A partir disso, as amostras foram congeladas, liofilizadas, moídas e armazenadas em embalagens laminadas em temperatura de 0 ºC (Figura 4.2).

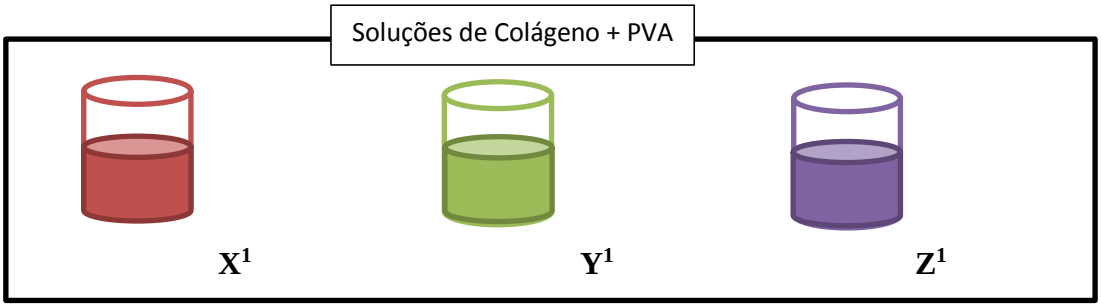
Figura 4.2 – Fluxograma da extração e purificação do colágeno

Fonte: Próprio autor

Após obtenção do colágeno puro, 3 soluções poliméricas com PVA (álcool povililíco) (ACS Científica, Sumaré, SP, Brasil) + Colágeno foram produzidas, sendo essas: Colágeno de **Tilápia do Nilo** + Água destilada + PVA **(X^1)**; Colágeno de **Tucunaré-açu** + Água Destilada+ PVA **(Y^1)** e Colágeno de **Acará-severo**+ Água Destilada +PVA **(Z^1)** (Figura 4.3).

Para produção da solução 0,5g de colágeno de cada peixe + 5g de PVA foram solubilizados em 100 ml água destilada a 60ºC/80ºC, via agitação mecânica de 300 rpm durante 2 horas até a obtenção de uma alta viscosidade.

Figura 4.3 – Esquema para demonstrar as soluções de Colágeno + PVA de cada espécie de peixe. +

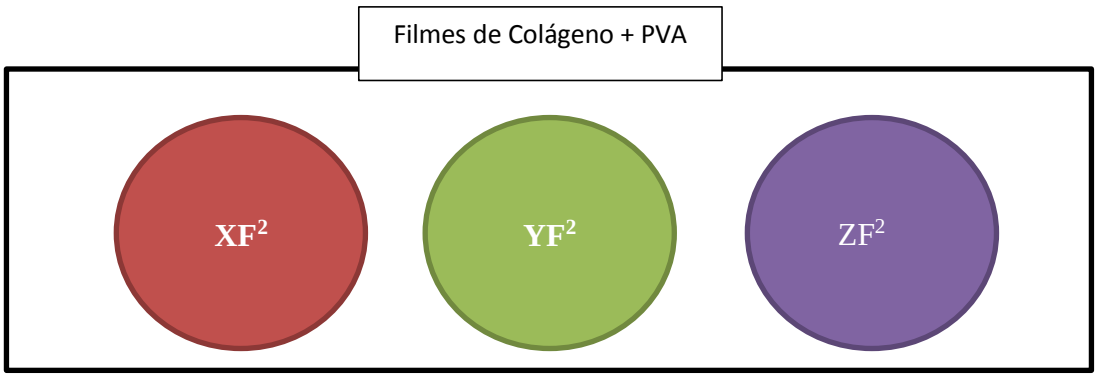


Fonte: Próprio autor.

A partir disso, 50 ml de cada solução **X¹**, **Y¹**, **Z¹**, foram depositadas em formas de silicone com dimensões de 26,5 cm x 18 cm x 3 cm e posteriormente armazenadas em congelador a 0ºC durante 24h, visando a evaporação de solventes e a formação de um filme polimérico. Vale ressaltar que o Álcool polivinílico será utilizado para aumentar a resistência mecânica do produto final 10% Colágeno para 90% de PVA.

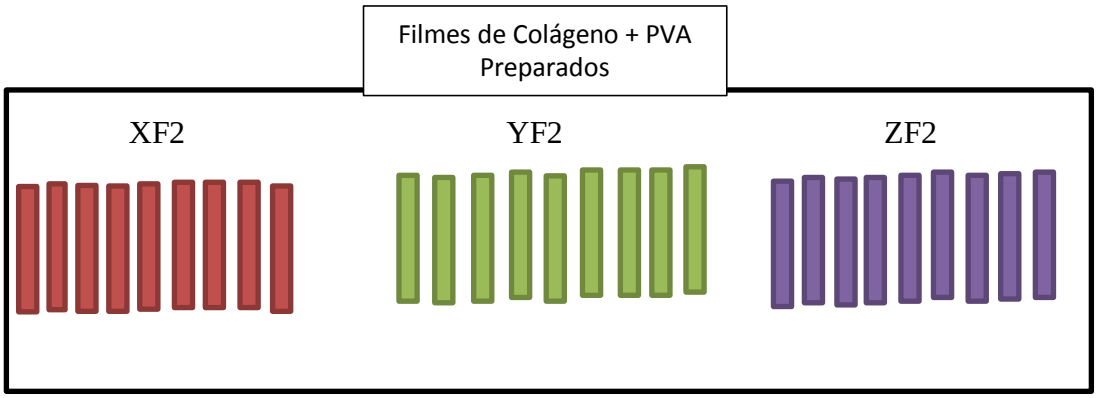
Após 24h os filmes poliméricos foram formados, sendo esses: **Colágeno de Tilápia** + PVA (**XF²**), Colágeno de **Tucunaré – açu** + PVA (**YF²**) e Colágeno de **Acará-açu** (**ZF²**) (Figura 4.4). Os polímeros foram preparados e recortados em dimensões de 45 mm X 5mm, obtendo-se no total 27 filmes, sendo 9 de cada espécie. Os melhores 5 polímeros foram selecionados para serem submetidos aos testes de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliar morfologia e aos testes de tração.

Figura 4.4 – Esquema demonstrativo dos filmes de colágenos obtidos de cada espécie de peixe.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4.5 – Representação dos filmes de Colágenos recortados em 45 mm x 5 mm x 0,5 mm.



Fonte: Próprio autor.

Com a finalidade de investigar as propriedades mecânicas dos filmes, um experimento de tração "pull-to break" foi realizado com uma máquina de teste de material. Para isso, cada esteira foi recortada em seções de 45 mm de comprimento x 5 mm de largura (Figura 4.5), sendo montado com fita adesiva para evitar escorregar do suporte de fixação (ASTM D882). As cinco amostras de cada espécie serão colocadas no sentido vertical e com velocidade de carregamento de 0,5 mm/min. Após a fratura dos filmes, os 15 polímeros passarão por um microscópio eletrônico de varredura da Tescan® modelo MIRA 3 para avaliar morfologia de superfície externa e interna.

É importante destacar que houve a selecão do polímero com melhores resultados e esse foi submetido à técnica de *electrospinning* para averiguar seu comportamento, o experimento foi limitado a uma espécie de peixe por conta de restrições apresentadas pela fonte. Nesse sentido, uma solução composta por colágeno hidrolisado da pele de peixe, com Álcool Povilínico P.S (PVA) (ACS Científica, Sumaré, SP, Brazil), foi solubilizada em 100 ml de água destilada (ASFER Industria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brazil) a uma rotação de 300rpm, temperatura de 60º C durante 2 horas. A solução foi resfriada em temperatura de meio ambiente e colocada em uma seringa 3ml (SALDANHA RODRIGUES LTDA., Manaus, AM, Brazil) onde houve a aclopação de uma agulha (22Gx1" - 0,7x25 mm) com diâmetro interno de 0,70mm (SALDANHA RODRIGUES LTDA., Manaus, AM, Brazil).

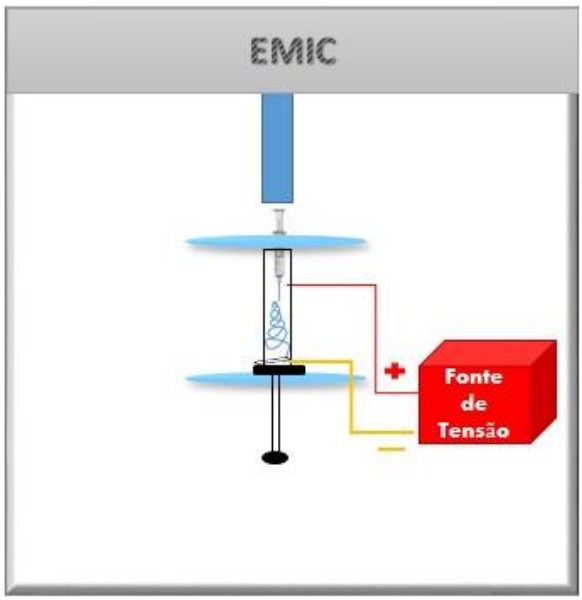
O sistema seringa-agulha foi isolado em um tubo plástico recortado de 45 mm proveniente de uma seringa de 20 ml (SALDANHA RODRIGUES LTDA., Manaus, AM,

Brazil), sendo que, em sua rolha de retenção, houve a aclopação de um papel alumíno para o depósito da eletrofiação.

Todo o sistema, então, foi posicionado na máquina Emic DL2000 **(**Emic, São josé dos Pinhais, PR, Brazil**),** onde se aplicou a força de 1 N na base do êmbolo da seringa de 3 ml. Assim, a partir fonte de alta tensão COCKCROFT – WALTON (PS ENERGIA LIVRE E PROJETOS, Belém, PA, Brazil) o polo positivo foi aclopado na haste da agulha, enquanto que no seu bisel formou-se uma gota de 0,2 ml. Um orifício de 1 mm foi realizado próximo a flange da seringa de 20 ml para conexão com o polo negativo (Figura 4.6).

A eletrofiação ocorreu no sentido vertical com uma tensão de 6,7 kV e uma distância de 3 cm entre a agulha-anteparo durante 30 minutos. Após o ensaio, a superfície de alumínio foi removida da rolha de contenção para ser submetida à microscopia eletrônica de varredura Tescan® modelo VEGA 3.

Figura 4.6 – Diagrama do processo de *electrospinning* da solução de colágeno selecionada.

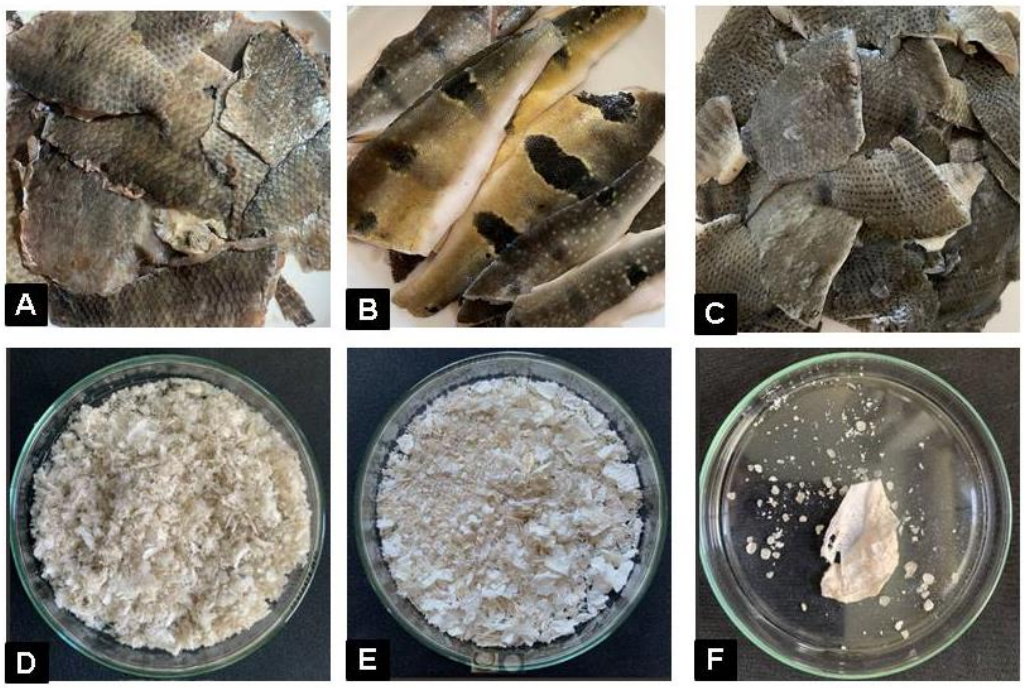


Fonte: Próprio autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível obter 440 gramas de pele de 10 unidades de Tilápia do Nilo; (Figura 5.1 – A); 296 gramas de pele de 7 unidades de Tucunaré (Figura 5.1- B); 307.61 gramas de pele de 10 unidades e de Acará severo (Figura 5.1- C). As facilidades de obtenção das espécies ocorreram na seguinte ordem: *Oreochromis niloticus*, *Cichla temensis*, *Heros severus*, isso pode ter, em função da disponibilidade da espécie no mercado (pesca) e com as questões sazonais hidrológicas.

Figura 5.1 – Peles de peixes dissecadas da Tilápia do Nilo (A), Tucunaré-açu (B) e Acará severo (C). Colágeno puro/seco da *Oreochromis niloticus* (C), *Cichla temensis* (E), *Heros severus* (F).



Fonte: Próprio autor

A pesquisa de Virgilio *et al* (2022) averigou que a conectividade hidrológica e os filtros ambientais são essenciais para a estruturação das comunidades aquáticas, podendo levar à mudanças ecológicas na diversidade local e na composição de espécies de organismos. O estudo foi realizado em lagos marginais localizadas no médio rio Purus (oeste da Amazônia). Verificou-se que os períodos hidrológicos influenciaram na variação da diversidade alfa, enquanto que os diferentes tipos de conectividade determinaram o aumento da diversidade beta de peixes.

Heilpern *et al* (2022) constatou que resiliência de pesca depende de dois fatores como: o número inicial de espécies exploráveis, o potencial de compensação impulsionado pela competição e fatores de liberação de predação, sendo importante para determinar o status da pesca e garantir sua sobrevivência, e a longo prazo, sustentabilidade.

A Tilápia do Nilo foi à espécie com maior facilidade de obtenção para a pesquisa elaborada, fatores como facilidade de alimentação e procriação, favorece a sua criação em diversos lugares. Nesse sentido, o estudo de Stauffer Jr *et al* (2022) afirmou que *Oreochromis niloticus* tem grande probabilidade de colonização devido a sua história de vida com: taxa de crescimento rápido, tamanho grande em relação a *Oreochromis spp*. e seu repertório diversificado de alimentação. Os autores chegaram a conclusão que a Tilápia Nilo representa uma ameaça aos peixes nativos Lago Malawi, no lado da Tanzânia, visto que, causaria competição ou hibridização com congêneres nativos.

Uma revisão sistemática de literatura buscou identificar as lacunas relacionadas à introdução de peixes não nativos em diferentes ecossistemas de água doce brasileiros. Esse estudo avaliou algumas espécies, como *Oreochromis niloticus*, *Coptodon rendalli* ou *Cichla kelberi* e foi verificado que seus impactos permanecem amplamente inexplorados. Isso inviabiliza a compreensão adequada das consequências ecológicas e socioeconômicas da introdução de peixes em ecossistemas nativos, especialmente em regiões de alta biodiversidade como a Amazônia (ROCHA; GARCÍA-BERTHOU; CIANCIARUSO, 2023). Apesar de não haver um bom controle da introdução da Tilápia do Nilo em diversas regiões do Brasil, o estudo de Forneck *et al* (2021) constatou que as instalações de aquicultura impulsionam a introdução e o estabelecimento da Orechromis niloticus não nativa em riachos Neotropicais, Brasil.

A segunda espécie com maior facilidade de obtenção para pesquisa foi o Tucunaré – açu, peixe amazônico, de coloração amarela, com algumas listras pretas na vertical e comprimeto aproximado de 20 cm, vale ressaltar que sua pele destoou macroscopicamente quando comparada com os outros animais estudados na pesquisa.

A literarura afirma que o *Cichla temensis* tem revelância na pesca comercial, na subsistência da região; somado a isso, foi constatado que a média para recrutamento e captura é em torno de 1,88, anos com comprimento aproximado de 21,5 cm; vale ressaltar que o peixe pode alcançar 33,00 cm de comprimento quando apresenta 3 anos de idade (CAMPOS; CATARINO; FREITAS, 2019).

Os autores Coffill-Rivera, Neal e Allen (2023) afirmam que devido à popularidade e o valor, o tucunaré-açu é uma espécie com potencial candidato à aquicultura, entretanto, pouco se sabe sobre as condições físico-químicas ideais em habitats naturais, que são importantes, para o desenvolvimento de protocolos de incubação para manejo, desova e engorda. Os autores chegaram à conclusão que a espécie é sensível às temperaturas elevadas, devendo ser criadas em aproximadamente 25º- 30º, sendo sensíveis à hipóxia à 35ºC.

O peixe com maior dificuldade de obtenção para realização do estudo foi o Acará-severo, pertencente à mesma família da Tilápia do Nilo - *Cichlidae*. Os animais obtidos apresentaram o comprimeto aproximado de 10 cm e apesar de ter comprimento inferior a *Oreochromis niloticus* notou-se extrema semelhança macroscópica entre a pele das duas espécies.

O *Herus severus* é uma espécie amazônica com potencial para psicultura ornamental, no entanto, os manejos de alimentação e densidade de estocagem ainda são desconhecidos na larvicultura para permitir a produção racional da espécie em cativeiro, foi constatado por meio de estudos que a espécie deve ser cultivada com 5 larvas e alimentadas com 250 náuplios em 4 alimentações diárias (ABE *et al*., 2016).

Castro-Castellón *et al* (2023) elaborou uma pesquisa que comprovou que o *Herus severus* pode ser cultivado em biofloco, sendo alimentado utilizando-se beterraba e cenoura, visto que, promoveram o enriquecimento da dieta dos peixes com pigmentos. Vale ressaltar

que a beterraba ajudou a obter taxas de sobrevivência acima de 90% e parâmetros de crescimento semelhantes às dietas comerciais com e sem pigmentos.

Os dados obtidos na literatura são importantes para compreender a criação, alimentação e manejo do Acará-severo. Foi possível notar a carência de pesquisas científicas do *Herus severus* que apesar relevante para pesca ornamental, ainda necessita de estudos para maior compreenssão da espécie e sua aplicação no setor industrial.

A partir do processamento das peles dos peixes obtiveram-se amostras de colágeno puro liofilizado de cada espécie com 3.32 g de Tilápia (Figura 5.1 – D), 2.53 g de Tucunaré (Figura 5.1 – E) e 0.5 g de Acará Severo (Figura 5.1 – F), os respectivos rendimentos foram calculados baseados no estudo de Vate, Undeland e Abdollahi (2022), sendo esses: 0,754%, 0,854% e 0,162%.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Peso do colágeno seco liofilizado da pele de peixe}}{\text{Peso úmido das peles de peixes sem tratamento}} \times 100$$

Os resultados demonstraram que o Tucunaré- açu apresentou maior desempenho na obtenção do colágeno, seguido da Tilápia e por último o acará-severo, vale ressaltar que todos foram submetidos ao mesmo processo de extração de proteína. Segundo a literatura essa diferença pode ocorrer por fatores como: discrepância entre as espécies de peixes, fatores biológicos (por exemplo, grau de reticulação) ou diferenças nos protocolos de extração de colágeno (CRUZ-LÓPEZ *et al*., 2021).

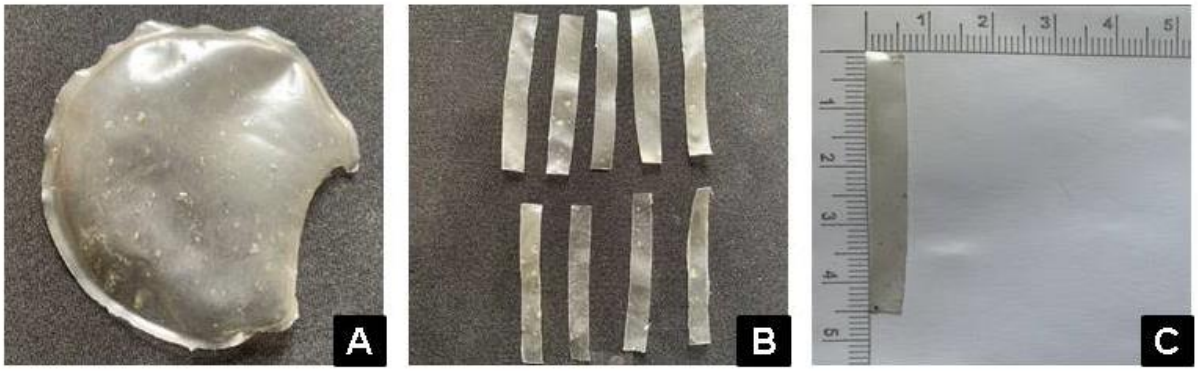
A diferença entre as espécies, anatomia, estrutura da pele, tamanho são de fato aspectos que podem influenciar na quantidade do produto final. Santos Corrêa *et al* (2023) notou que o redimento filés, cabeças de *Oreochromis niloticus* em relação ao de *Cynoscion virescens* apresentam menor rendimento de filé, porém com alto teor de proteína e baixo teor de lipídios, sendo a tilápia superior à da corvina, principalmente em termos de proteínas e aminoácidos comparado ao filé de corvina. Já a pesquisa de Le *et al* (2020) averigou que dos três peixes estudados o *Chitala ornata* apresentou maior redimento de colágeno, seguido do *Pangasianodon hypophthalmus* e *Oreochromis niloticus.* A literatura aponta também a

presença de outros parâmetros que afetam o produto final da extração de colágeno de fontes de peixe como temperatura, tempo e concentração de solvente (JAFARI *et al*., 2020).

Para produção dos filmes, soluções com 100 ml Água + 0,5g de colágeno de cada peixe + 5 g de Alcool Povilinico foram preparadas. Após isso, 9 ml de fluidos de cada espécie foram despejados separadamente em recipientes de silicone com dimensões 26,5 cm x 18 cm x 3cm e armazenados em 0º C durante 24 horas. Nesse sentido, filmes arredondados de cada espécie peixe foram formados, sendo esses recortados em 9 amostras retangulares com dimensões de 45 mm x 5 mm.

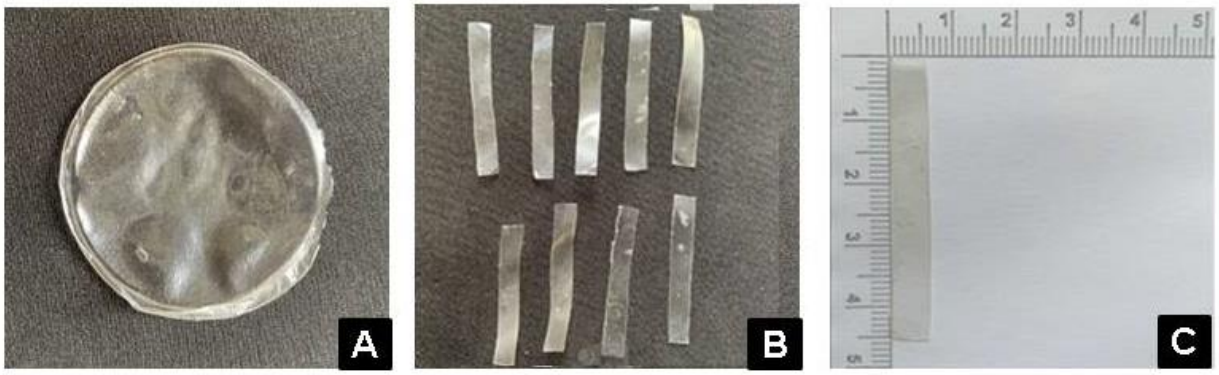
O filme de Tilápia do Nilo (Figura 5.2- A, B, C) apresentou-se irregular, granulado, com pedaços de colágeno e pigmentação tendendo ao amarelo. Já o polímero de Tucunaré – açu (Figura 5.3 – A, B, C) demonstrou-se homogêneo, com superfície lisa e com a coloração inclinando-se ao transparente. Enquanto que no filme do Acará-severo (Figura 5.3 – A, B, C) evidenciou-se a presença de bolhas, irregular, parcialmente granulado com pequenos pedaços de colágeno e com a tonalidade próxima ao transparente. Os polímeros obtidos apresentam variação na cor e na textura macroscópica devido ao colágeno de cada espécie.

Figura 5.2 – (A) Filme de *Oreochromis niloticus* com 10% Colágeno + 90% de Álcool Povilínico. (B) 9 amostras do mesmo polímero preparadas e recortadas. (C) Dimensão 45 mm x 5 mm de cada espécime.



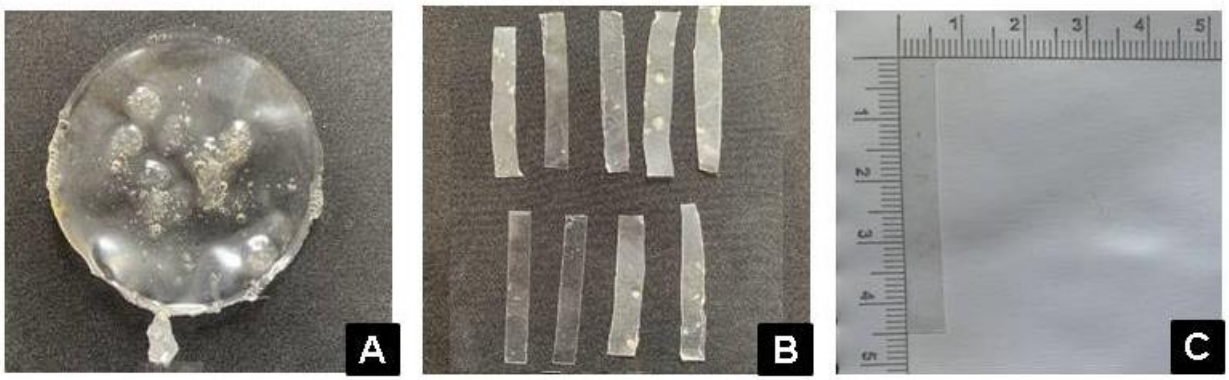
Fonte: Próprio autor.

Figura 5.3 – (A) Filme de *Cichla temensis* com 10% Colágeno + 90% de Álcool Povilínico. (B) 9 amostras do mesmo polímero preparadas e recortadas. (C) Dimensão 45 mm x 5 mm de cada espécime.



Fonte: Próprio autor

Figura 5.4 – (A) Filme de *Heros severus* com 10% Colágeno + 90% de Álcool Povilínico. (B) 9 amostras do mesmo polímero preparadas recortadas. (C) Dimensão 45 mm x 5 mm de cada espécime**.**



Fonte: Próprio autor

Essas variações macroscópicas também foram notadas no estudo de Zulkiflee *et al* (2023) que fabricou um filme de colágeno/álcool polivinílico (PVA) fortificado com elastina, sendo esse polímero sobreposto a uma esponja de colágeno, formando uma biomatriz híbrida de duas camadas. Os estratos foram estudados de maneira individualizada e agregados uns aos outros. Macroscopicamente a esponja de colágeno (NCL – grupo controle) assumiu uma cor

branca devido à cor original do colágeno obtido de pernas de ovelhas, enquanto que o outro grupo de esponjas compostas de colágeno/elastina/PVA/Genipina (CL/CL) exibiu uma cor amarelada em função da reticulação com genipina.

A fabricação de hidrogéis de PVA/ Colágeno II consegue atender os requisitos de engenharia e regeneração de tecido cartilaginoso, visto que apresentam interconectividade, estrutura de porosidade, módulo de elasticidade médio, boa biocompatibilidade, citocompatibilidade, proliferação célular (LAN *et al*., 2020).

A mistura desses polímeros possibilita à melhoria mecânica de materiais biodegradáveis sem agregar muito custo, que é crucial para substituir os plásticos convencionais para a segurança ambiental (ZHOU; ZHAU, 2022). Diante do exposto, dependendo do grau de concentração de cada polímero (PVA e Colágeno) os filmes formados podem ser aplicados tanto na engenharia tecidual quanto na engenharia de produção, possibilitanto a aplicação em diversas áreas do setor industrial.

Para realização do experimento mecânico houve a seleção dos melhores 5 filmes de colágeno de cada espécie com dimensões de 45 mm x 5 mm x 0.05 mm (ASTM D882). Os polímeros foram submetidos a um teste de tração denomidado “Pull to break” na máquina universal Emic DL2000 **(**Emic, São josé dos Pinhais, PR, Brazil**),** aplicando-se velocidade de carregamento de 0,5 mm/min (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Experimento de mecânico *Pull to break* realizado na máquina universal Emic DL2000.

Fonte: Próprio autor

Os resultados do ensaio de tração, obtidos a partir da média de 5 filmes de cada espécie, demostraram que em relação ao módulo de elasticidade a *Oreochromis niloticus* apresentou 327,02 MPa; o *Cichla temensis* 227,76 MPa e o *Heros severus* 299,02 MPa. Enquanto que relação à tensão de ruptura e a deformação à fratura foi possível averiguar os seguintes resultados: Tilápia do Nilo 5,46 MPa e 147,13 %; o Tucunaré-açu 13,48 MPa e 150,33 %; Acará-severo 8,53 MPa e 161,35 % (Tabela 1) (Figura 5.6; Figura 5.7; Figura 5.8).

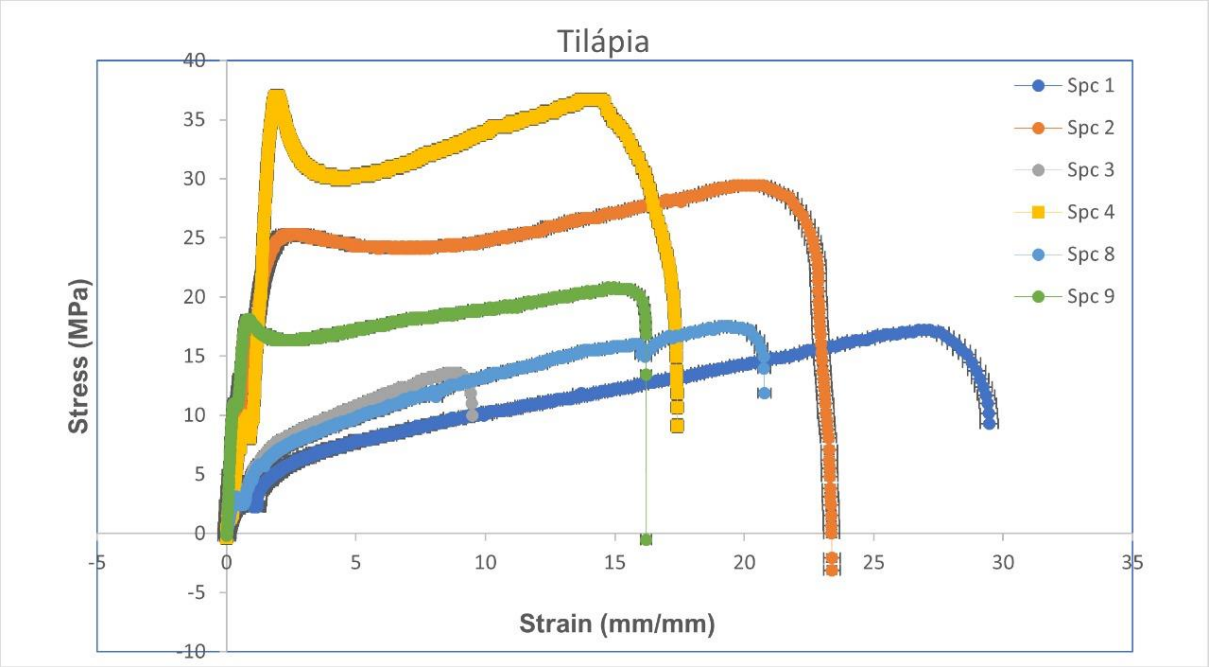
Tabela 5.1 – Resultados dos testes mecânicos avaliando módulo de elasticidade (MPa), Tensão de ruptura (MPa) e Deformação a fratura (%) dos filmes de colágeno das espécies de peixes.

Origem	**Módulo de elasticidade (MPa)**	**Tensão de ruptura (MPa)**	**Deformação a fratura**	**Processamento**
Tilápia do Nilo	327,02 ± 317,03	5,46 ± 4,42	147,13 %	PVA/COL
Tucunaré-açu	227,7 ± 270,13	13,48 ± 27,05	150,33 %	PVA/COL
Acará-severo	299,02 ± 204,83	8,53 ± 6,28	161,35 %	PVA/COL

Fonte: Próprio autor

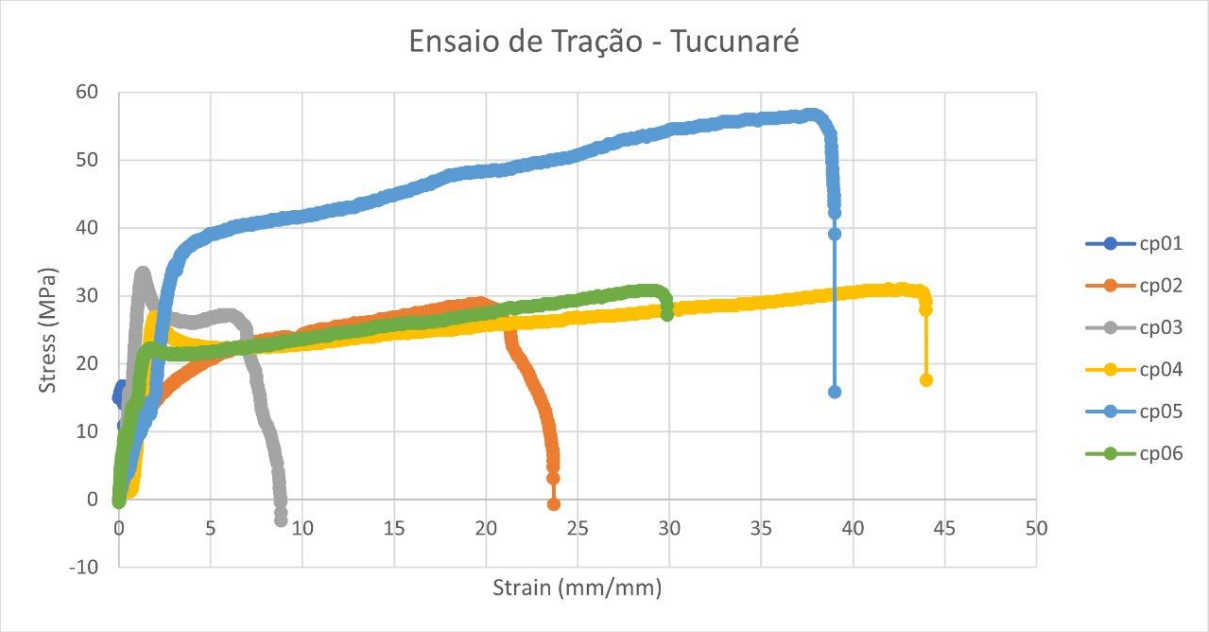
.

Figura 5. 6 – Gráfico dos ensaios de tração realizado com os filmes da Tilápia do Nilo.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5. 7 – Gráfico dos ensaios de tração realizado com os filmes do Tucunaré-açu.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.8 – Gráfico dos ensaios de tração realizado com os filmes do Acará-severo.

Fonte: Próprio autor.

Pesquisadores notaram que a presença de PVA possibilita aprimoramento em relação à rigidez e inelasticidade, por meio de testes mecânicos em filmes compostos de hidrogel de celulose bacteriana (CB) /colágeno (COL) /álcool polivinílico (PVA). Os polímeros à base CB/COL obtiveram um módulo de *Young's* de 284.69±21.95 MPa, enquanto que os filmes de CB/COL/PVA alcançaram os valores de 330.24±31.30 MPa (YANG et al, 2022).

O Colágeno associado com PVA permite a redução da taxa deformação e da tensão de ruptura. Zhou *et al* (2021) estudou esse fato quando comparou uma membrana de camada dupla de Colágeno/Álcool povilínco (COL/PVA) com a uma membrana de álcool povilílico (PVA). Notaram-se leves discrepâncias entre os dois produtos; visto que polímero de PVA apresentou uma taxa de deformação a 222 ± 33% e uma tensão de ruptura a 429 ± 98 KPa (0.429 MPa), enquanto que o polímero de COL/PVA obteve 193 ± 27% e 419 ± 51 KPa (0.419 MPa).

Yang *et al* (2022) realizou um estudo comparativo entre um polímero de celulose bacterina + colágeno (CB/COL), com um composto de celulose bacteriana + colágeno+ álcool povilinico (CB/COL/PVA). Constatou-se aprimoramento mecânico na membrana de CB/COL/PVA já que apresentou a tensão de ruptura a 76.23±1.63 MPa e taxa de defomação a

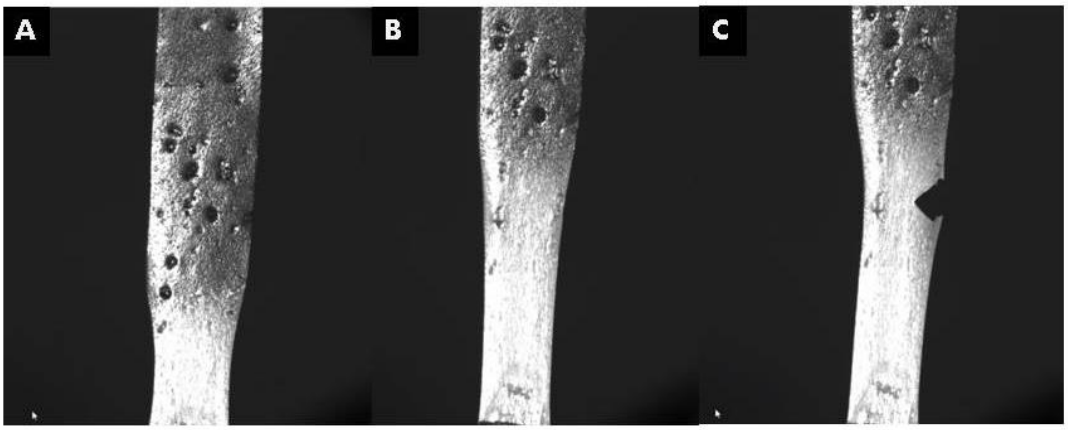
18.60±1.34 %, sendo que no polímero de CB/COL os valores foram menores com 22.81 ± 0.74 MPa e 8.04 ± 0.36%.

Quando comparado o resultado das três espécies de peixes, notou-se na Tilápia do Nilo maior inelasticidade/rigidez, ruptura do polímero sob menor tensão e menor taxa de deformação (Figura 5.9). O Acará- severo apresentou resultados intermediários (Figura 5.10), enquando que o Tucunaré-açu expressou maior elasticidade, rompimento quando submetido a uma maior tensão e elevada deformação (Figura 5.11).

Esses dados mecânicos podem ser associados com a porosidade dos filmes de colágeno, sendo esses resultados explícitos na área interna do polímero após a fratura. O fator variante para produção dos filmes foram as diferentes peles de peixes, com isso é possível notar que o produto final sofre influência de acordo com o colágeno obtido de cada espécie.

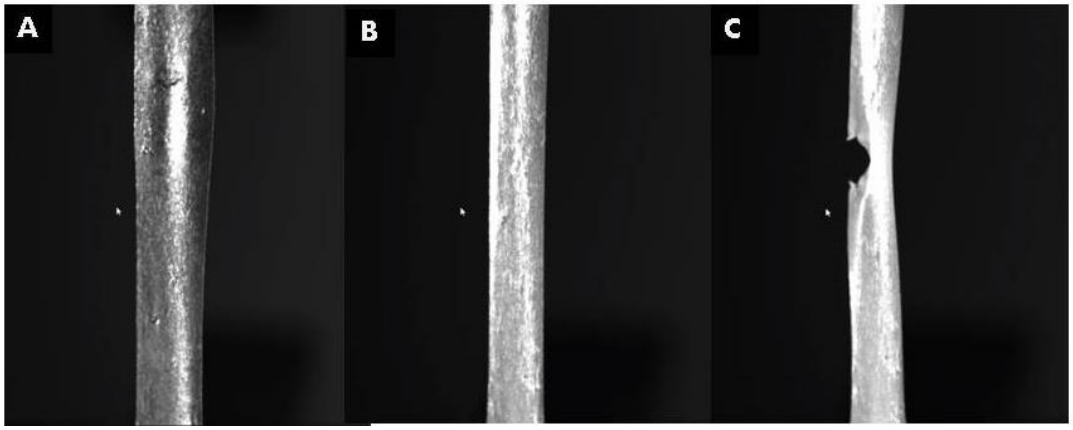
Para corroborar tal afirmação, um estudo comparativo entre a Tilápia do Nilo, a Carpa Prateada e a Carpa-do-limo concluiu que não só as propriedades físico-químicas, mas também as capacidades de formação de filme do colágeno estão relacionadas à conformação e formação primária da estrutura das moléculas da proteína (TANG *et al*., 2015).

Figura 5.9 – Filme de colágeno do peixe Tilápia. (A) Filme em repouso. (B) Filme submetido à tração. (C) Início da fratura do polímero.



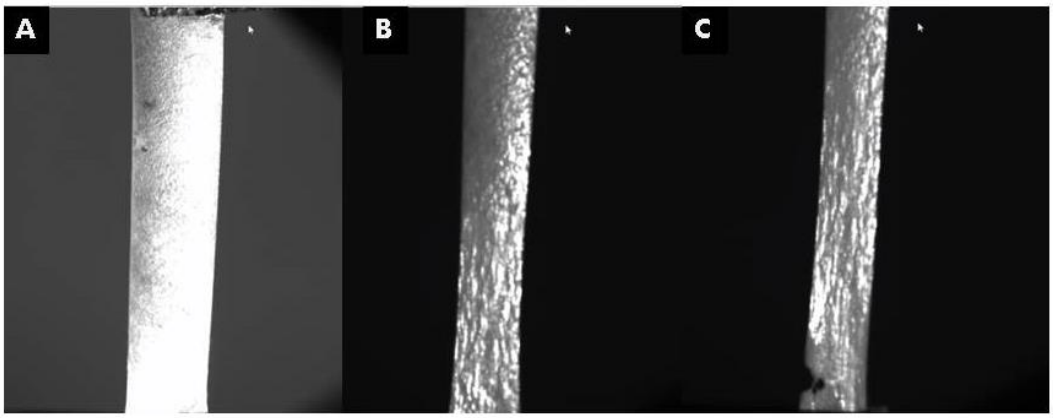
Fonte: Próprio autor.

Figura 5.10 – Filme de colágeno do peixe Acará-severo. (A) Filme em repouso. (B) Filme submetido à tração. (C) Início da fratura do polímero.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.11 – Filme de colágeno do peixe Tucunaré-açu. (A) Filme em repouso. (B) Filme submetido à tração. (C) Início da fratura do polímero.

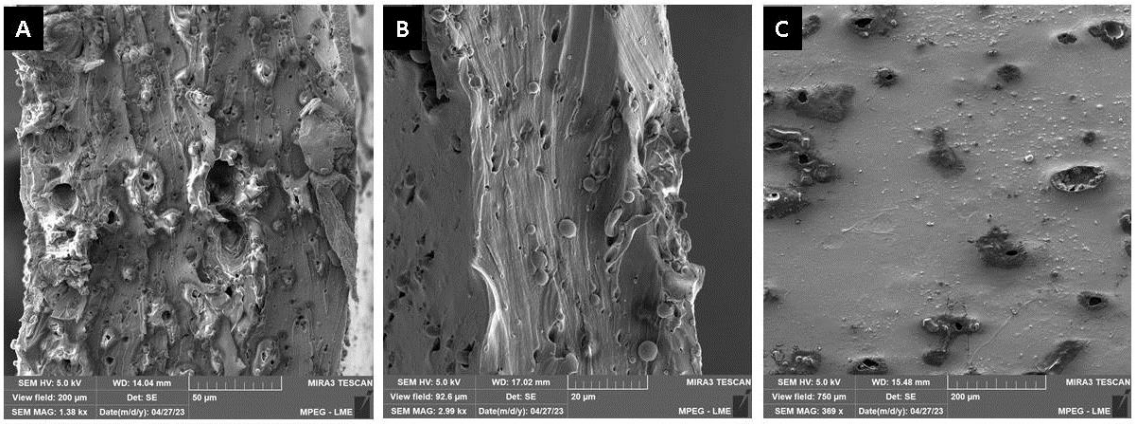


Fonte: Próprio autor.

Após os ensaios de tração os filmes foram submetidos à análise de microscopia eletrônica de varredura, sendo averiguada a parte interna e a superfície de cada um. Notou-se boa interação de PVA e Colágeno de todos os polímeros formados não havendo microscopicamente separação de fases. Já na área de fratura de cada filme constatou-se mais homogeneidade do tucunaré-açu, seguido do acará-severo e da tilápia do Nilo. Já na área de

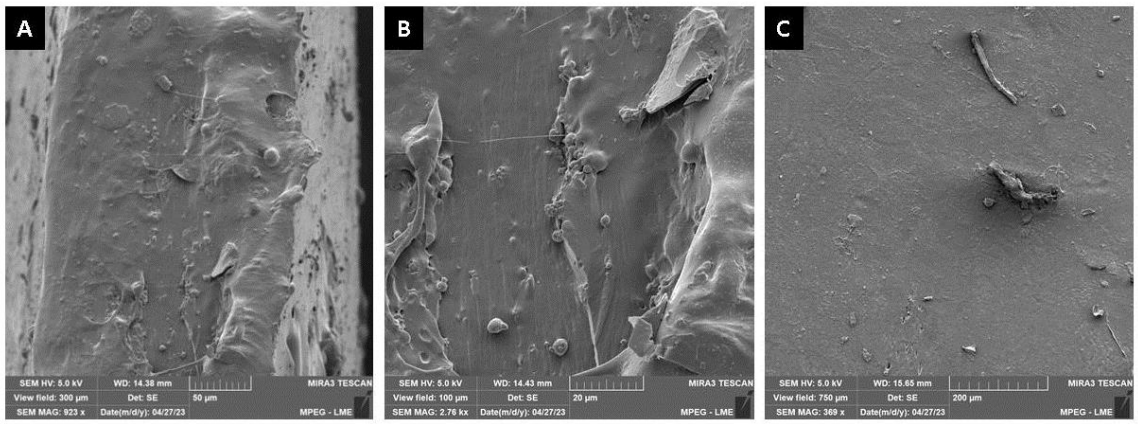
superfície houve similaridade entre *Cichla temensis e Heros severus*, apenas destoando *Oreochromis niloticus* (Figura 5.12; Figura 5.13; Figura 5.14).

Figura 5.12 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero da espécie *Oreochromis niloticus.* (A) Área de fratura do filme com aumento de 50 µm. (B) Área interna com aumento de 20 µm. (C) Área de Superfície com aumento de 200 µm.



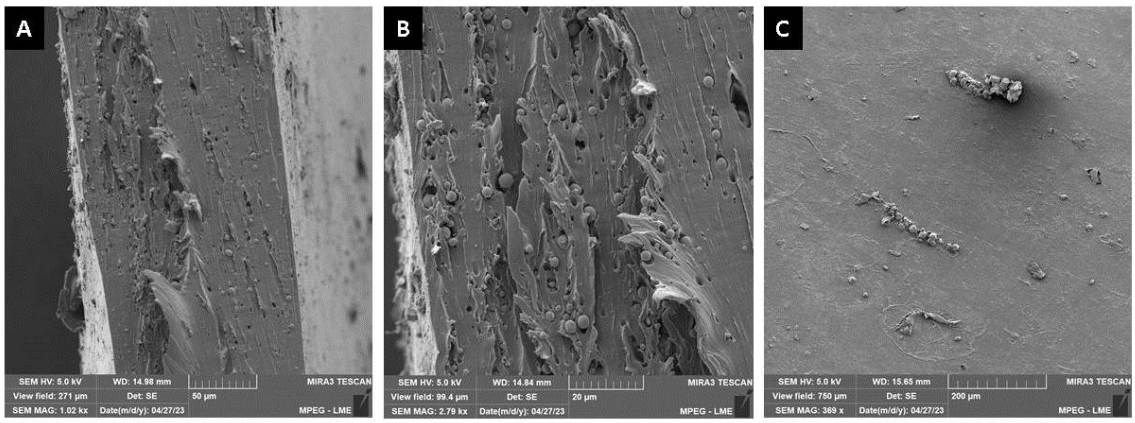
Fonte: Próprio autor

Figura 5.13– Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero da espécie *Cichla temensis.* (A) Área de fratura do filme com aumento de 50 µm. (B) Área interna com aumento de 20 µm. (C) Área de Superfície com aumento de 200 µm.



Fonte: Próprio autor

Figura 5.14 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero da espécie *Heros severus* . (A) Área de fratura do filme com aumento de 50 µm. (B) Área interna com aumento de 20 µm. (C) Área de Superfície com aumento de 200 µm.



Fonte: Próprio autor

Pesquisas revelam que polímeros sintéticos como o álcool povilínico podem ser escolhidos como hidrogéis, além disso, é capaz de proporcionar suporte estrutural e similar às propriedades viscoelásticas da matrix extracelular de cartilagem; vale ressaltar que as incorporações de polímeros naturais podem aprimorar a biocompatibilidade e reduzir reações imunes (LI *et al*., 2023).

O estudo de Zhou *et al* (2021) avaliou por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura que o colágeno apresenta uma estrutura microporosa que permite o crescimento interno de células, enquanto o PVA atua como barreira densa para inibir outras células de invadir o colágeno. Logo, enquanto o colágeno permite a proliferação celular, o álcool povilínico atua como barreira, permitindo um espaço para o crescimento de células recém-produzidas. Somado a isso, os autores chegaram à conclusão que a membrana PVA/Col apresenta a propriedade hidrofílica favorável.

Assim como os resultados obtidos no MEV dos filmes do Acará – severo, Tucunaré - açu e Tilápia do Nilo, o estudo de Zhou *et al* (2020) também averiguou que a morfologia de superfície de colágeno PVA/Col (90:10) apresentou camada superficial homogênea e densa, com pequenos poros observados, sendo que a proporção 70:30 e 50:50 de álcool povilínico

associado com colágeno proporcionou maior porosidade, permitindo assim maior adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal e gengivais dos humanos.

Apesar da similaridade dos polímeros formados, observou-se que maior porosidade na seguinte ordem: Tilápia do Nilo, Acará - severo e Tucunaré –açu. Esse dado é relevante já que pesquisas afirmam que uma estrutura de malha interpenetrante porosa garante uma boa permeabilidade, o que promoveria maior proliferação celular e a cicatrização de feridas (WANG *et al*., 2018).

Analisando a proposta industrial para fabricação de biomateriais, foi constatado que a Tilápia do Nilo apresentou maior facilidade de obtenção, modulo de elasticidade, porosidade e rendimento razoável. Os peixes amazônicos apresentaram valores bons, mas, não tão significativos quanto os da *Oreochromis niloticus* (Tabela 2).

Tabela 5.2 – Comparação dos dados obtidos entre espécies de peixes. Resultado ótimo: +++. Resultado razoável: ++. Resultado Baixo: +.

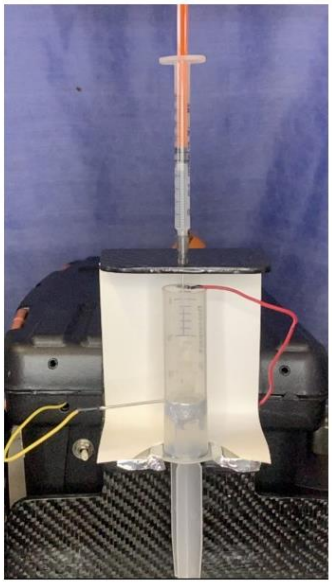
Espécie de Peixes / Parâmetros	**Facilidade de Obtenção**	**Rendimento**	**Porosidade**	**Módulo de Elasticidade**	**PONTUAÇÃO TOTAL DO Nº DE +**
Tilápia do Nilo	+++	++	+++	+++	11
Tucunaré-açu	++	+++	+	++	8
Acará- severo	+	+	++	++	7

Fonte: Próprio autor

Devido aos resultados obtidos, a solução de colágeno hidrolisado da pele Tilápia (0,23 % w/v), com Álcool Povilínico P.S (PVA) (2,09 % w/v) foi selecionada para ser submetida a técnica de *electrospining* utilizando uma fonte de alta tensão COCKCROFT – WALTON. O polímero foi eletrofiado com uma tensão de 6,3 KW à uma distância de 3 cm., foram formadas nanofibras com gotejamento da solução (Figura 5.15).

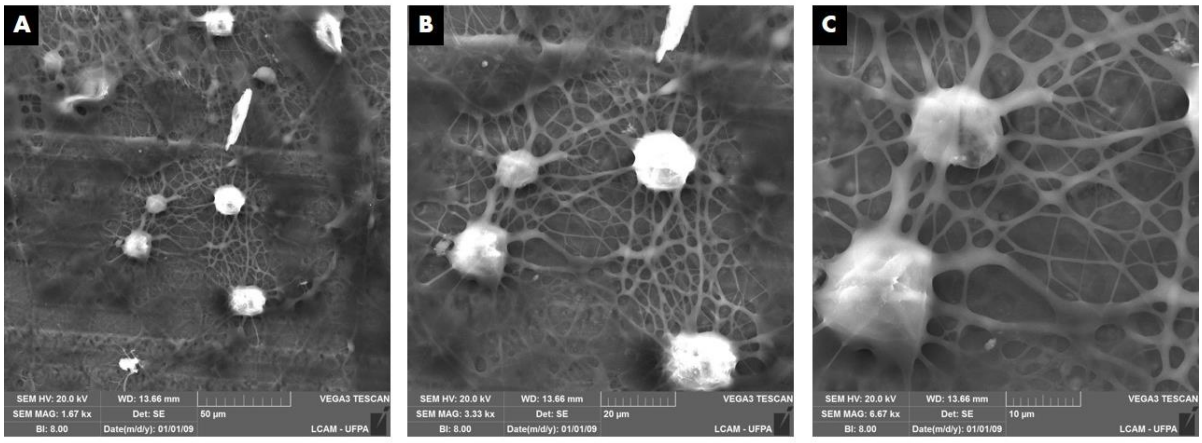
.

Figura 5.15 – Sistema montado seringa para eletrofiação da solução da Tilápia no Nilo +PVA com uma fonte de alta tensão COCKCROFT – WALTON.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.16. – Microscopia eletrônica da eletrofiação da solução de Tilápia do Nilo + PVA. (A) Imagem com aumento de 50 μm. (B) Imagem com aumento de 20 μm. (C) Imagem com aumento de 10 μm.



Fonte: Próprio autor

A técnica de *electrospinning* oferece uma plataforma tecnológica versátil para a produção de sistemas nanoestruturados sob medida com diversas aplicações, sendo os

biopolímeros marinhos ideais para o desenvolvimento de novos biomateriais (ILIOU *et al*., 2022).

Dependendo da aplicação pretendida, como geração de pele, cicatrização de feridas, reparação óssea ou cartilaginosa; os materiais eletrofiados baseados em colágeno marinho podem ser fabricados usando estratégias para atender às especificações desejadas, como: propriedades mecânicas, tamanho e estrutura interna dos poros, encapsulamento celular, taxa de degradação e incorporação de bio-aditivos (LIU *et al*., 2022).

Alguns parâmetros devem ser avaliados durante o processo de eletrofiação como, a solução que deve ter uma concetração ideal (nanofibras uniformes), maior peso molecular (fibras mais lisas), maior condutividade (diâmetro menor e uniforme da nanofibra) e viscosidade ideal (ejeção constante do jato/agulha). Além disso, parâmetros do processo que controlam a ejeção do polímero, a suavidade da fibra e melhor conectividade (maior tensão aplicada). Somado a isso, a taxa de alimentação lenta e distância ideal da ponta ao coletor também é relevante para o processo, assim como os parâmetros ambientais (temperatura operacional, umidade) que também desempenham papéis significativos no controle da espessura/finura das nanofibras (CHINNAPPAN *et al*., 2022).

A técnica de *electrospinning* foi usada para produção de mantas de policaprolactona (PCL), associado com Colágeno Tipo 1 (COL 1) e álcool povilínico (PVA). A solução de PCL foi usada para aprimorar a morfologia das fibras e suas propriedades mecânicas, enquanto o PVA foi utilizado pata melhorar o processamento do COL 1. A eletrofiação foi aplicada a uma distância de 12 cm com uma tensão de 16 kV. O material produzido revelou não citotoxicidade, alta absorção de líquidos, hidrofílico, capacidade de liberação de colágeno, sendo um material promissor para regeneração de tecidos (ANAYA MANCIPE *et al*., 2023).

Pesquisadores avaliaram a interação entre células epiteliais pulmorares humanas A549 e as fibras de *electrospinning* compostas de PVA/COL, foram constatadas que as nanofribras com diferentes tamanhos não só moldaram a célula, mas também participaram da expressão gênica relacionada à transição epitelial-mesenquimal (EMT). Vale ressaltar que o processo EMT é relevante para a geração de células-tronco mesenquimais, sendo essas participantes no processo de embriogênese, cicatrização de feridas e metástase de câncer. As mantas com

nanofibras de diâmetro 170 nm apresentaram regulação positiva do gene em 4 a 5 vezes quando comparada com as fibras de 90nm ou 240nm (LI *et al*., 2018).

As imagens obtidas da microscopia eletrônica de varreduras demonstraram fibras com raios próximos a 10 µm e diâmetro de 100nm a 2.000nm, vale ressaltar que a solução apresentou boa viscosidade e facilidade para eletrofiação. Essa técnica pode ser aplicada sobre os filmes elaborados para aprimorar a agregação e receptibilidade celular, permitindo assim a produção de uma membrana com resistência a tração, alta porosidade, com alto rendimento, baixo custo associada com o aumento da biocompatibilidade devido à técnica de *eletrospinning* (Figura 5.16).

Os filmes poliméricos de PVA com colágeno de peixe podem ser aplicados na engenharia tecidual como um bom biomaterial e quando associado à técnica de eletrofiação esses possuem maior compatibilidade celular. Esses polímeros podem ser preparados e ajustados para formação de membranas com aplicação na área odontológica.

Foi constatado que esses filmes de Colágeno com PVA podem auxiliar na regeneração gengival (Tian Zhou *et al*., 2020) no crescimento, prolifereação e diferenciação das células do ligamento periodontal (PAN *et al*., 2021). Somado a isso, filmes poliméricos podem ser usados na odontologia para Regeneração Tecidual Óssea (RTO) quando associado Colágeno- álcool povilínico - Hidroxiapatita e com radiação gama 25 kGy (ARIESANTI *et al*., 2023).

Mesmo sem a presença da Hidroxiapatita, estudos demonstram que a agregação das substâcias usadas nos filmes poliméricos (COL/PVA) é capaz de aumentar a viabilidade das células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC) e induzir a osteogênese (ZHOU *et al*., 2021).

.

Pesquisas promissoras também mostram que hidrogéis de cartilagem PVA/Col-II possuem alta interconectividade, porosidade, módulo de elasticidade médio e boa, biocompatibilidade pelo método de congelamento-descongelamento, proliferação celular que podem ser aplicados e atender requisitos de engenharia e regeneração de tecidos cartilaginosos (LAN *et al*., 2020).

É possível notar alta aplicabilidade dos filmes poliméricos utilizando diferentes tipos de colágenos de peixes. As disparidades encontradas entre os peixes amazônicos e a Tilápia do Nilo não foram tão significativas em todos os aspectos, sendo interessante destacar a reprodução de todos os testes nas três espécies estudadas, reafirmando a alta capacidade de bioprospecção da investigação do colágeno dos peixes amazônicos.

6. CONCLUSÃO

Com alta aplicabilidade na área médica, odontológica, farmacêutica, industrial, alimentícia; com baixo custo de produção; porosidade; agregação celular; passível de esterilização; resistente à tração; sustentável; sem risco de transmissão de doenças zoonóticas; com possibilidade de usar diferentes espécies de peixes os filmes de Colágeno e Alcool Povilínico demostraram ótimos resultados.

É importante destacar que apesar da Tilápia do Nilo apresentar melhores resultados em alguns aspectos, os peixes amazônicos também permitiram a reprodutibilidade para formação dos filmes. A espécie *Oreochromis niloticus* obetve facilidade de obtenção que é essencial para facilitar os processos industriais; rendimento razoável; boa porosidade que é excelente para permitir agregação celular no polímero caso seja usado como biomateria; além disso não deformou muito quando foi submetido à uma tensão.

A espécie *Cichla temensis* foi obtida com facilidade razoável, apresentou excelente redimento o que permite boa produção do material, baixa porosidade que não é tão interessante para agregação celular; mas pode ser aplicada em outras áreas industriais – medicinais em que essa barreira impermeável torna-se interessante. Além disso, contatou-se módulo de elasticidade bom.

A espécie de *Herus severus* foi de dificil obtenção e baixíssmo rendimento, o que torna difícil produção do material. Apesar disso, a porosidade apresentou superioridade em relação ao tucunaré-açu, enquanto que seus módulos de elasticidades foram parecidos.

Para aplicação na área de biomateriais a Tilápia do Nilo demonstrou melhores resultados; entretanto, os peixes amazônicos podem ser usados por outros setores na área industrial devido as propriedades mecânicas favoráveis. Além disso, pode-se destacar a possibilidade de modificação dos filmes com adição de outros produtos, como hirdroxiapatita, em estudos futuros. Essas alterações podem compensar os resultados inferiores apresentados pelos peixes amazônicos em relação a tilapia do Nilo.

Devido aos dados encontrados a solução de *Oreochromis niloticus* foi submetida a técnica de eletrofiação, sendo observado a obtenção de nanofibras com gotejamento. Esse dado é relevante por permitir melhores resultados na área biológica do filme polimérico.

Com isso, é possível notar que há possibilidade de aplicação de todos os filmes poliméricos na área de biomateriais, principalmente em área odontológica. Esses filmes, podem ser usados para regeneração tecidual e óssea nas especialidades de cirurgia, implantodontia, periodontia entre outros. Valem ressaltar a diversificação dos materiais odontológicos, com isso as disparidades encontradas entre as três espécies de peixes podem ser ajustadas e disponibilidazadas para diversas funções, sendo essas similares ou diferentes.

São necessários estudos in vivo para avaliar à agregação celular nos filmes, visto que, já foi comprovada que a estrutura/organização interna do colágeno de cada peixe é diferente, sendo assim resultados promissores podem ser encontrados. É possível notar alta aplicabilidade industrial dos filmes de colágeno, sendo essas na área farmacêutica, biomédica, odontológica, têxtil, materiais biodegradáveis/sustentáveis entre outros. Com isso, mais estudos são necessários para investigar não apenas a Tilapia do Nilo, mas também para averiguar mais resultados promissores dos peixes amazônicos e suas aplicabilidades em diferentes áreas industriais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Higo Andrade et al. Manejo alimentar e densidade de estocagem na lavricultura do peixe ornamental amazônico Heros severus. 2016.

ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. 2015.

ANAYA MANCIPE, Javier Mauricio et al. Novel polycaprolactone (PCL)-type I collagen core-shell electrospun nanofibers for wound healing applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 111, n. 2, p. 366-381, 2023.

ANTOINE, Elizabeth E.; VLACHOS, Pavlos P.; RYLANDER, Marissa Nichole. Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. Tissue Engineering Part B: Reviews, v. 20, n. 6, p. 683-696, 2014.

ARIESANTI, Yessy et al. Characterization of Polyvinyl Alcohol–Collagen–Hydroxyapatite Composite Membrane from Lates calcarifer Scales for Guided Tissue and Bone Regeneration. **European Journal of Dentistry**, 2023.

ASSAD, Irfana et al. Protein based packaging of plant origin: Fabrication, properties, recent advances and future perspectives. International Journal of Biological Macromolecules, 2020.

BI, Chunhuan et al. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 128, n. 2, p. 234-240, 2019.

BLACKSTONE, Britani N.; GALLENTINE, Summer C.; POWELL, Heather M. Collagen-based electrospun materials for tissue engineering: a systematic review. Bioengineering, v. 8, n. 3, p. 39, 2021.

BONFERONI, Maria Cristina et al. Biomaterials for Soft Tissue Repair and Regeneration: A Focus on Italian Research in the Field. Pharmaceutics, v. 13, n. 9, p. 1341, 2021.

BORGHEZAN, Elio De Almeida et al. A review on fish sensory systems and Amazon water types with implications to biodiversity. Volume 8, 2021.

BOSE, Shirsha et al. Dry vs. wet: Properties and performance of collagen films. Part I. Mechanical behaviour and strain-rate effect. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 111, p. 103983, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Riispoa). Pescados e derivados, C.7, seção 1. Brasília, 1952.

CAMPELO, D. A. V. et al. Estratégias alimentares na larvicultura do peixe ornamental amazônico acará-severo (Heros severus)(Heckel, 1840). Arquivo Brasileiro de Medicina **Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 1601-1608, 2019.

CAMPOS, C. P.; CATARINO, M. F.; FREITAS, C. E. C. Stock assessment of the peacock bass Cichla temensis (Humboldt, 1821), an important fishing resource from the middle Negro river, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 506-510, 2019.

CARUSO, Gabriella et al. Fishery wastes as a yet undiscovered treasure from the sea: Biomolecules sources, extraction methods and valorization. Marine Drugs, v. 18, n. 12, p. 622, 2020.

CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. Relatório Científico (FAPESP). Botucatu, SP. 46p. 2006.

CASTRO-CASTELLÓN, Andrés Elías et al. Evaluation of growth development and pigmentation of Heros severus cultured in a biofloc system with enriched pigment diets. **Latin american journal of aquatic research**, v. 51, n. 1, p. 88-97, 2023.

CHEN, Jingjing et al. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process in vivo. Marine drugs, v. 17, n. 1, p. 33, 2019.

CHINNAPPAN, Balaji Ayyanar et al. Electrospinning of biomedical nanofibers/nanomembranes: effects of process parameters. **Polymers**, v. 14, n. 18, p. 3719, 2022.

COFFILL-RIVERA, Manuel E.; NEAL, J. Wesley; ALLEN, Peter J. Effects of temperature on metabolic rate and lower dissolved oxygen tolerance of juvenile speckled peacock bass Cichla temensis. **Journal of Fish Biology**, v. 102, n. 3, p. 635-642, 2023.

COPPOLA, Daniela et al. Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications. Marine drugs, v. 18, n. 4, p. 214, 2020.

CRUZ-LÓPEZ, Honorio et al. Comparison of collagen characteristic from the skin and swim bladder of Gulf corvina (Cynoscion othonopterus). **Tissue and Cell**, v. 72, p. 101593, 2021.

DAGOSTA, Fernando CP; DE PINNA, Mário. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. Bulletin of the American Museum of Natural History, v. 2019, n. 431, p. 1-163, 2019.

DIAS, Maria Tereza Pinto Medeiros et al. Neovaginoplasty using Nile Tilapia fish skin as a new biologic graft in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. Journal of minimally invasive gynecology, v. 27, n. 4, p. 966-972, 2020.

DORIA, Carolina Rodrigues Da Costa et al. The silent threat of non-native fish in the Amazon: ANNF database and review. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 9, 2021.

DUAN, Kaikai et al. A novel high mechanical and excellent hydrophilic electrospun polyurethane-silk-bioactive glass nanofiber film for rotator cuff injury repair. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 10, p. 51746, 2022.

ELBIALY, Zizy I. et al. Collagen extract obtained from Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and α-SMA genes expression. BMC Veterinary Research, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2020.

FIAKOS, Gabriella; KUANG, Zeming; LO, Evan. Improved skin regeneration with acellular fish skin grafts. Engineered Regeneration, v. 1, p. 95-101, 2020.

FIGUEIREDO, Carlos Alberto Junior; VALENTE, Airton Saboya Junior. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. 2008.

FORNECK, Sandra Carla et al. Aquaculture facilities drive the introduction and establishment of non-native Oreochromis niloticus populations in Neotropical streams. **Hydrobiologia**, v. 848, p. 1955-1966, 2021.

FRANCO, M. L. R. S. et al. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. Archivos de zootecnia, v. 62, n. 237, p. 21-32, 2013.

GALLO, Nunzia et al. An overview of the use of equine collagen as emerging material for biomedical applications. Journal of functional biomaterials, v. 11, n. 4, p. 79, 2020.

GHOSH, S.K.; MANDAL, D. 2017. Sustainable energy generation from piezoelectric biomaterial for noninvasive physiological signal monitoring. ACS Sustain. Chem. Eng. v.5, n.10, p. 8836–8843, 2017

GULEVSKY, A. K.; SHCHENIAVSKY, I. I. COLLAGEN: STRUCTURE, METABOLISM, PRODUCTION AND INDUSTRIAL APPLICATION. Biotechnologia Acta, v. 13, n. 5, 2020.

HE, Yujing et al. An Overview on Collagen and Gelatin-Based Cryogels: Fabrication, Classification, Properties and Biomedical Applications. **Polymers**, v. 13, n. 14, p. 2299, 2021.

HEILPERN, Sebastian A. et al. Biodiversity underpins fisheries resilience to exploitation in the Amazon river basin. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 289, n. 1976, p. 20220726, 2022.

HU, Zhang et al. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus): Characterization and wound healing evaluation. Marine drugs, v. 15, n. 4, p. 102, 2017.

ILIOU, Konstantina et al. Marine biopolymers as bioactive functional ingredients of electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, p. 314, 2022

JAFARI, Hafez et al. Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. Polymers, v. 12, n. 10, p. 2230, 2020.
JÉZÉQUEL, Céline et al. A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. Scientific data, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2020.

JIN, Shue et al. Fish collagen and hydroxyapatite reinforced poly (lactide-co-glycolide) fibrous membrane for guided bone regeneration. Biomacromolecules, v. 20, n. 5, p. 2058-2067, 2019.

JUNG, Seunggon et al. Effect of Gellan Gum/Tuna Skin Film in Guided Bone Regeneration in Artificial Bone Defect in Rabbit Calvaria. Materials, v. 13, n. 6, p. 1318, 2020.

JÚNIOR, Arialdo M. Silveira; FAUSTINO, Silvia Maria M.; CUNHA, Alan C. Bioprospection of biocompounds and dietary supplements of microalgae with immunostimulating activity: a comprehensive review. PeerJ, v. 7, p. e7685, 2019.

JÚNIOR, Edmar Maciel Lima et al. Lyophilised tilapia skin as a xenograft for superficial partial thickness burns: a novel preparation and storage technique. Journal of Wound Care, v. 29, n. 10, p. 598-602, 2020.

KIRSNER, Robert S. et al. Fish skin grafts compared to human amnion/chorion membrane allografts: A double-blind, prospective, randomized clinical trial of acute wound healing. Wound Repair and Regeneration, v. 28, n. 1, p. 75-80, 2020.

KOIDE, Takaki; NAGATA, Kazuhiro. Collagen biosynthesis. Collagen, p. 85-114, 2005.

KULKARNI, Priyanka; MANIYAR, Mithun. Utilization of fish collagen in pharmaceutical and biomedical industries: waste to wealth creation. Life Sci Inform Publications, v. 6, n. 3, p. 11, 2020.

KULLANDER, S. O. Cichlid Fishes of the Amazon River Drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History. **Stockholm, Naturhistoriska Riksmuseet**, p. 431, 1986.

KULLANDER, Sven O.; FERREIRA, Efrem JG. A review of the South American cichlid genus Cichla, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 17, n. 4, p. 289-398, 2006.

LAN, Weiwei et al. Biomimetic polyvinyl alcohol/type II collagen hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 9, p. 1179-1198, 2020.

LAN, Weiwei et al. Biomimetic polyvinyl alcohol/type II collagen hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 9, p. 1179-1198, 2020.

LATRUBESSE, Edgardo M. et al. Damming the rivers of the Amazon basin. Nature, v. 546, n. 7658, p. 363-369, 2017.

LE, Thi Minh Thuy et al. Comparison of acid-soluble collagen characteristic from three important freshwater fish skins in Mekong Delta Region, Vietnam. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. e13397, 2020.

LI, Dongsheng et al. Evaluation of a novel tilapia-skin acellular dermis matrix rationally processed for enhanced wound healing. Materials Science and Engineering: C, v. 127, p. 112202, 2021.

LI, Heng et al. Recent advances of PVA-based hydrogels in cartilage repair application. **Journal of Materials Research and Technology**, 2023.

LI, Xiuchun et al. Human lung epithelial cells A549 epithelial-mesenchymal transition induced by PVA/Collagen nanofiber. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 390-397, 2018.

LIMA JÚNIOR, E. M. Avaliação pré-clínica da pele da tilápia (Oreochromis niloticus), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

LIU, Chao; SUN, Jiao. Hydrolyzed tilapia fish collagen induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. Biomedical Materials, v. 10, n. 6, p. 065020, 2015.

LIU, Shaoqiong et al. Marine collagen scaffolds in tissue engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 92-103, 2022.

LIU, Yang et al. Study on the stability and cellular affinity of gelatin-polysaccharide composite films. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 108, n. 11, p. 2230-2239, 2020.

MATHEW-STEINER, Shomita S.; ROY, Sashwati; SEN, Chandan K. Collagen in Wound Healing. Bioengineering, v. 8, n. 5, p. 63, 2021.

MERELES, Marcos A. et al. Discrimination of species and populations of the genus Cichla (Cichliformes: Cichlidae) in rivers of the Amazon basin using otolithic morphometry. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.

MEYER, Michael. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. Biomedical engineering online, v. 18, n. 1, p. 1-74, 2019.
MIENALTOWSKI, Michael J.; BIRK, David E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. Progress in heritable soft connective tissue diseases, p. 5-29, 2014.

MISHRA, Prashant K. et al. Synthesis of Biodegradable Films Using Gamma Irradiation from Fish Waste. Waste and Biomass Valorization, v. 12, n. 5, p. 2247-2257, 2021.

NAOMI, Ruth et al. Current Insight of Collagen Biomatrix for Gingival Recession: An Evidence-Based Systematic Review. Polymers, v. 12, n. 9, p. 2081, 2020.

NOSOUDI, Nasim et al. Electrospinning live cells using gelatin and pullulan. Bioengineering, v. 7, n. 1, p. 21, 2020.

PAN, Zhengjun et al. Potential In Vitro Tissue-Engineered Anterior Cruciate Ligament by Copolymerization of Polyvinyl Alcohol and Collagen. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 32, n. 2, p. 799-803, 2021.

PORTIER, François et al. Stabilization of collagen fibrils by gelatin addition: a study of collagen/gelatin dense phases. **Langmuir**, v. 33, n. 45, p. 12916-12925, 2017.

QIAN, Yunzhu et al. The preosteoblast response of electrospinning PLGA/PCL nanofibers: effects of biomimetic architecture and collagen I. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4157, 2016.

QIAN, Yunzhu et al. Triple PLGA/PCL scaffold modification including silver impregnation, collagen coating, and electrospinning significantly improve biocompatibility, antimicrobial, and osteogenic properties for orofacial tissue regeneration. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 41, p. 37381-37396, 2019.

RATNER, Buddy D. et al. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **San Diego, California**, p. 162-4, 2004.

REISS, Paul et al. Color pattern variation in Cichla temensis (Perciformes: Cichlidae): Resolution based on morphological, molecular, and reproductive data. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 59-70, 2012.

REISS, Paul; GROTHUES, Thomas M. Geometric morphometric analysis of cyclical body shape changes in color pattern variants of Cichla temensis Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae) demonstrates reproductive energy allocation. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 103-112, 2015.

REZVANI GHOMI, Erfan et al. Collagen-based biomaterials for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 12, p. 1986-1999, 2021.

ROCHA, Barbbara Silva; GARCÍA-BERTHOU, Emili; CIANCIARUSO, Marcus Vinicius. Non-native fishes in Brazilian freshwaters: identifying biases and gaps in ecological research. **Biological Invasions**, v. 25, n. 5, p. 1643-1658, 2023.

SALVATORE, Luca et al. Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. Materials Science and Engineering: C, v. 113, p. 110963, 2020.

SANTOS CORRÊA, Stefane et al. Quality of Oreochromis niloticus and Cynoscion virescens fillets and their by-products in flours make for inclusion in instant food products. **Plos one**, v. 18, n. 2, p. e0279351, 2023.

Shoulders, M.D., Raines, R.T., 2009. Collagen structure and stability. Annual Review of Biochemistry 78, 929e958

STAECK, Wolfgang; SCHINDLER, Ingo. Description of a new Heros species (Teleostei, Cichlidae) from the Rio Orinoco drainage and notes on Heros severus Heckel, 1840. **Bulletin of Fish Biology Volume**, v. 15, n. 1/2, p. 121-136, 2015.

STAUFFER JR, Jay R. et al. Nile Tilapia, Oreochromis niloticus (Teleostei: Cichlidae): a threat to native fishes of Lake Malawi?. **Biological Invasions**, v. 24, n. 6, p. 1585-1597, 2022.

SUBHAN, Fazli et al. A review on recent advances and applications of fish collagen. Critical reviews in food science and nutrition, v. 61, n. 6, p. 1027-1037, 2021.

TANG, Jia; SAITO, Takashi. Biocompatibility of novel type I collagen purified from tilapia fish scale: an in vitro comparative study. BioMed research international, v. 2015, 2015.

TANG, Lanlan et al. Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 148-155, 2015

TERZI, Alberta et al. Sub-and Supramolecular X-Ray Characterization of Engineered Tissues from Equine Tendon, Bovine Dermis, and Fish Skin Type-I Collagen. Macromolecular bioscience, v. 20, n. 5, p. 2000017, 2020.

VATE, Naveen Kumar; UNDELAND, Ingrid; ABDOLLAHI, Mehdi. Resource efficient collagen extraction from common starfish with the aid of high shear mechanical homogenization and ultrasound. **Food Chemistry**, v. 393, p. 133426, 2022.

VERDE, Maria Elisa Quezado Lima et al. Nile tilapia skin (Oreochromis niloticus) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. Acta histochemica, v. 123, n. 6, p. 151762, 2021.

VIRGILIO, L. R. et al. Effects of hydrological, environmental and spatial factors on fish diversity and community structure in oxbow lakes from the Amazon floodplain. **Limnologica**, v. 93, p. 125954, 2022.

WANG, Mingchao et al. Preparation and characterization of novel poly (vinyl alcohol)/collagen double-network hydrogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 41-48, 2018.

WIJAKSANA, I. Komang Evan et al. OPG and RANKL Expression in Osteoblast Culture after Application of Osphronemus Gourami Fish Scale Collagen Peptide. Journal of International Dental and Medical Research, v. 14, n. 2, p. 618-622, 2021.

XU, Ning et al. Marine-Derived Collagen as Biomaterials for Human Health. Frontiers in Nutrition, p. 493, 2021.

YANG, Qun et al. Mechanical and thermal properties enhancement and swelling behavior of bacterial cellulose/collagen/polyvinyl alcohol nanofiber hydrogel film. **Fibers and Polymers**, v. 23, n. 2, p. 305-314, 2022.

Zhang, W.; Chen, L.K.; Chen, J.L.; Wang, L.S.; Gui, X.X.; Ran, J.S.; Xu, G.W.; Zhao, H.S.; Zeng, M.F.; Ji, J.F.; et al. Silk fibroin biomaterial shows safe and effective wound healing in animal models and a randomized controlled clinical trial. Adv. Healthc. Mater. 2017, 6, 1700121.

ZHANG, Yuhan et al. Bilayer membrane composed of mineralized collagen and chitosan cast film coated with berberine-loaded PCL/PVP electrospun nanofiber promotes bone regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

ZHOU, Junbo; QIN, Zhao. Structure–mechanics relationship of hybrid polyvinyl alcohol-collagen composite by molecular dynamics simulations. **MRS Bulletin**, p. 1-10, 2022

ZHOU, Tian et al. Fabrication and characterization of collagen/PVA dual-layer membranes for periodontal bone regeneration. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 630977, 2021.

ZHOU, Tian et al. In vitro evaluation of poly (vinyl alcohol)/collagen blended hydrogels for regulating human periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts. International Journal of Biological Macromolecules, v. 163, p. 1938-1946, 2020.

ZHU, Shichen et al. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications. Journal of Materials Chemistry B, v. 6, n. 18, p. 2650-2676, 2018.

ZULKIFLEE, Izzat et al. Characterization of Dual-Layer Hybrid Biomatrix for Future Use in Cutaneous Wound Healing. **Materials**, v. 16, n. 3, p. 1162, 2023.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Valores dos 6 corpos de prova de cada espécie de peixe quando submetidos aos teste mecânicos. Os que estão destacados em vermelho foram as amostras eliminadas da média.

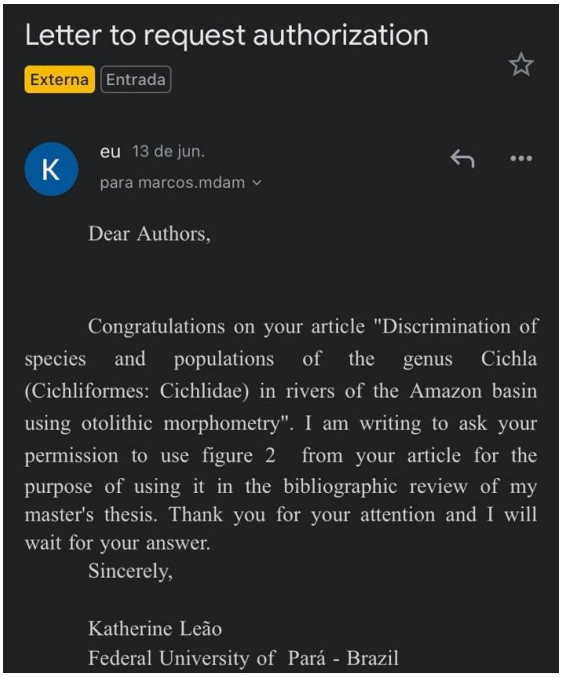
TILÁPIA	Force Max Load (N)	Force Break (N)	Stress Max Load (MPa)	**Stress Break (Mpa)**	**Deformation Break (mm)**	**Elast. Modul. (Mpa)**
1	17,22	15,15	7,23	**6,37**	**28,60**	**67,03**
2	29,44	0,69	13,46	**0,31**	**23,37**	**210,30**
3	**13,60**	**13,09**	**5,67**	**5,46**	**9,30**	**259,85**
4	37,02	12,91	14,10	**4,92**	**17,39**	**528,78**
5	17,56	16,36	7,07	**6,58**	**20,52**	**128,92**
6	20,83	18,25	10,44	**9,15**	**16,18**	**700,1**
Média				**5,46**	**21,21**	**327,02**

TUCUNARÉ	Force Max Load (N)	Force Break (N)	Stress Max Load (MPa)	**Stress Break (MPa)**	**Deformation Break (mm)**	**Elast. Modul. (MPa)**
1	16,70	16,01	6,29	**6,03**	**40,69**	**16,76**
2	28,93	5,68	10,12	**1,99**	**23,66**	**126,87**
3	33,40	0,34	12,17	**0,13**	**8,78**	**161,60**
4	30,99	13,60	11,48	**5,04**	**1,16**	**276,57**
5	56,65	43,39	70,81	**54,24**	**38,99**	**557,03**
6	**30,82**	**30,30**	**0,51**	**0,50**	**29,63**	**46,57**
MÉDIA				**13,48**	**22,65**	**227,76**

ACARÁ	Force Max Load (N)	Force Break (N)	Stress Max Load (MPa)	**Stress Break (MPa)**	**Deformation Break (mm)**	**Elast. Modul. (MPa)**
1	12,05	6,89	8,04	**4,59**	**23,52**	**52,50**
2	36,16	8,95	23,52	**5,82**	**42,96**	**228,80**
3	25,48	23,59	18,53	**17,16**	**45,01**	**462,16**
4	19,97	14,98	12,20	**9,15**	**25,99**	**460,71**
5	27,89	11,02	15,08	**5,96**	**0,61**	**290,95**
6	**9,81**	**9,64**	**4,42**	**4,34**	**43,75**	**13,32**
MÉDIA				**8,53**	**27,61**	**299,024**

ANEXO

ANEXO A – Solicitação e autorização dos autores para uso de imagens com direitos autorais.



Letter to request authorization

Externa Entrada

eu 13 de jun.
para marcos.mdam

Dear Authors,

Congratulations on your article "Discrimination of species and populations of the genus Cichla (Cichliformes: Cichlidae) in rivers of the Amazon basin using otolithic morphometry". I am writing to ask your permission to use figure 2 from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Thank you for your attention and I will wait for your answer.

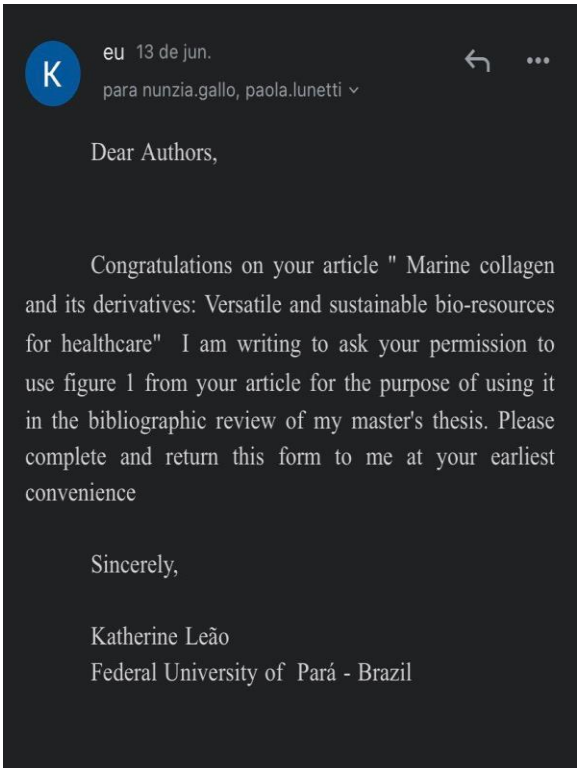
Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil

Marcos de Almeida 15 de jun.
para mim

Hi Katherine,
Thank you for congratulating our article.
Feel free to use the figure.

Abraços,
Marcos de Almeida Mereles
> Engenheiro de Pesca
> Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos



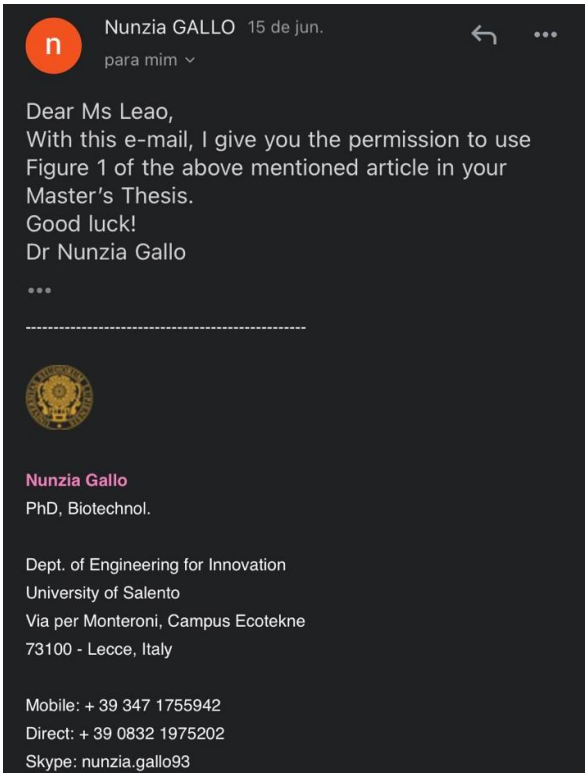
eu 13 de jun.
para nunzia.gallo, paola.lunetti

Dear Authors,

Congratulations on your article " Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare" I am writing to ask your permission to use figure 1 from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Please complete and return this form to me at your earliest convenience

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil



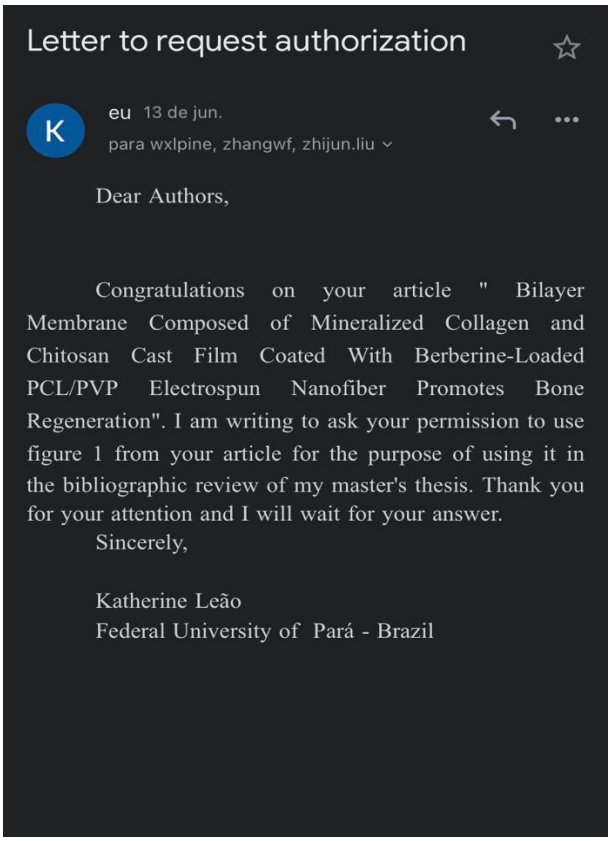
Nunzia GALLO 15 de jun.
para mim

Dear Ms Leao,
With this e-mail, I give you the permission to use Figure 1 of the above mentioned article in your Master's Thesis.
Good luck!
Dr Nunzia Gallo

Nunzia Gallo
PhD, Biotechnol.

Dept. of Engineering for Innovation
University of Salento
Via per Monteroni, Campus Ecotekne
73100 - Lecce, Italy

Mobile: + 39 347 1755942
Direct: + 39 0832 1975202
Skype: nunzia.gallo93



Letter to request authorization

eu 13 de jun.
para wxlpine, zhangwf, zhijun.liu

Dear Authors,

Congratulations on your article " Bilayer Membrane Composed of Mineralized Collagen and Chitosan Cast Film Coated With Berberine-Loaded PCL/PVP Electrospun Nanofiber Promotes Bone Regeneration". I am writing to ask your permission to use figure 1 from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Thank you for your attention and I will wait for your answer.

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil

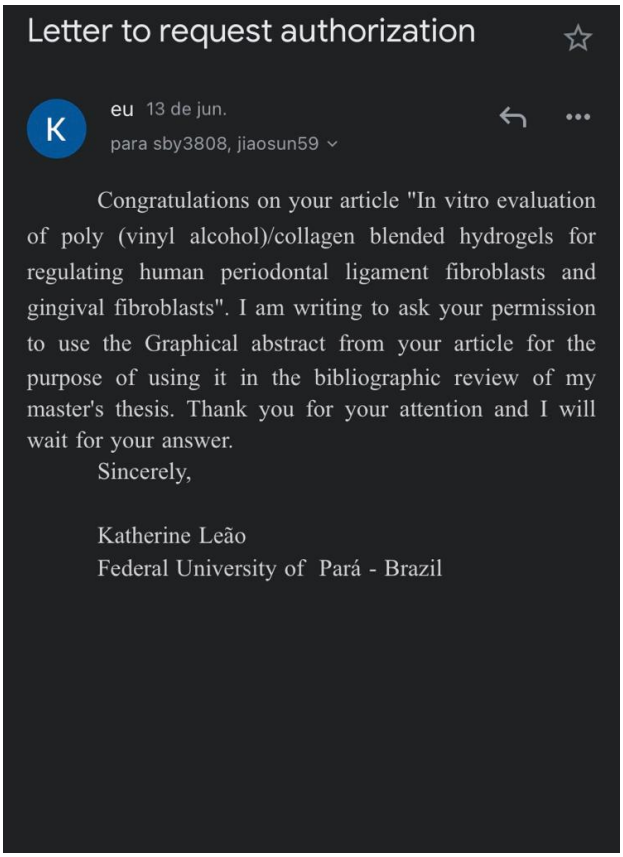
莫秀梅 13 de jun.
para mim

ok

莫秀梅
东华大学 生物与医学工程学院

Prof. Xiumei Mo
Donghua University, Shanghai, China
Tel: 0086-21-67792653
Hp: 0086-13311823642
Web: http://www.xiumeimo.com

发件人："KATHERINE ELICE PAES LEÃO COELHO" <katherine.coelho@itec.ufpa.br>
发送日期：2023-06-14 07:16:59
收件人：wangpeng8848@hotmail.com,xmm@dhu.edu.cn
主题：Letter to request authorization



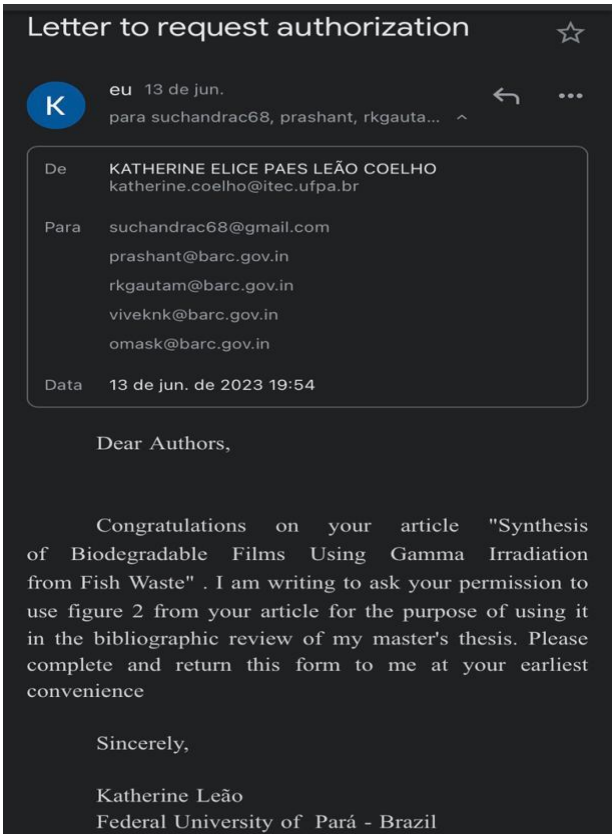
Letter to request authorization

eu 13 de jun.
para sby3808, jiaosun59

Congratulations on your article "In vitro evaluation of poly (vinyl alcohol)/collagen blended hydrogels for regulating human periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts". I am writing to ask your permission to use the Graphical abstract from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Thank you for your attention and I will wait for your answer.

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil



Letter to request authorization

eu 13 de jun.
para suchandrac68, prashant, rkgauta...

De KATHERINE ELICE PAES LEÃO COELHO
katherine.coelho@itec.ufpa.br

Para suchandrac68@gmail.com
prashant@barc.gov.in
rkgautam@barc.gov.in
viveknk@barc.gov.in
omask@barc.gov.in

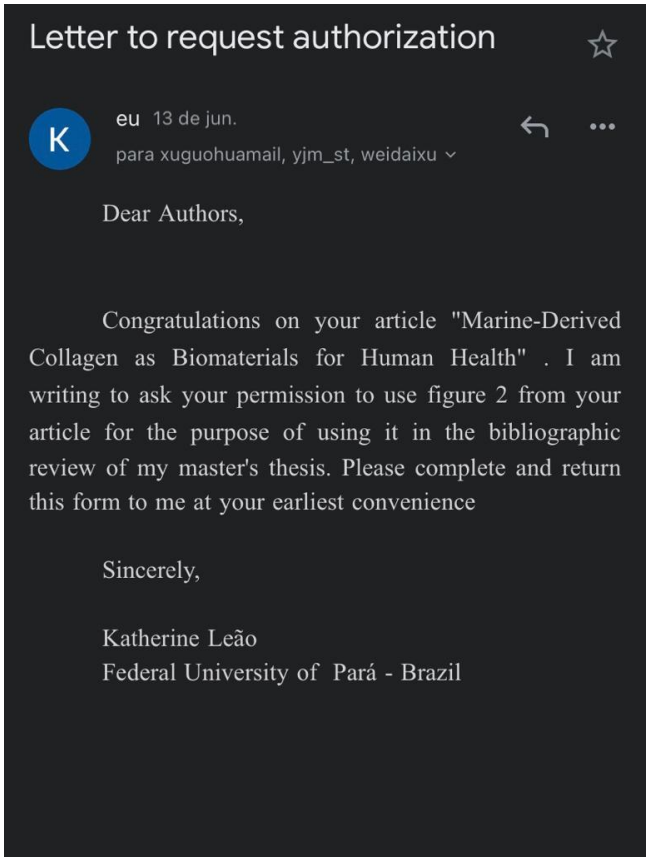
Data 13 de jun. de 2023 19:54

Dear Authors,

Congratulations on your article "Synthesis of Biodegradable Films Using Gamma Irradiation from Fish Waste" . I am writing to ask your permission to use figure 2 from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Please complete and return this form to me at your earliest convenience

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil



Letter to request authorization

eu 13 de jun.
para xuguohuamail, yjm_st, weidaixu

Dear Authors,

Congratulations on your article "Marine-Derived Collagen as Biomaterials for Human Health" . I am writing to ask your permission to use figure 2 from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Please complete and return this form to me at your earliest convenience

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil

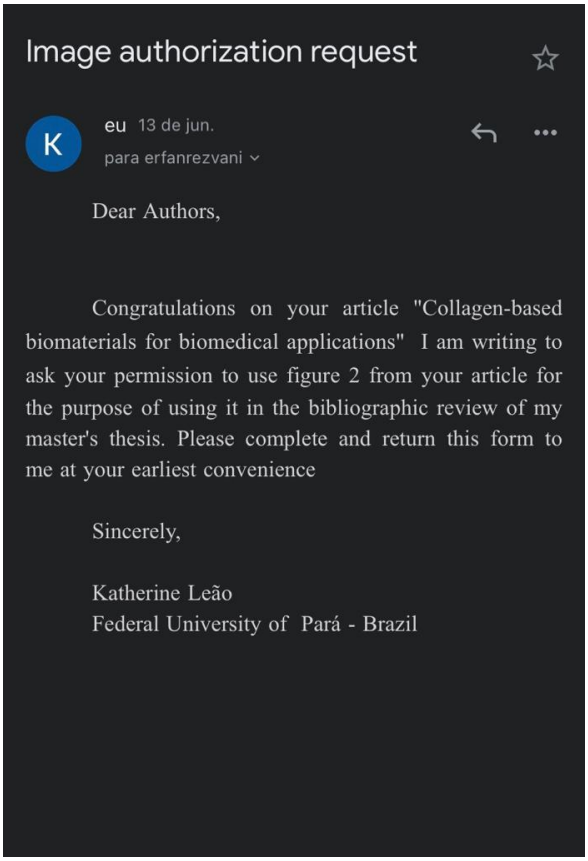


Image authorization request

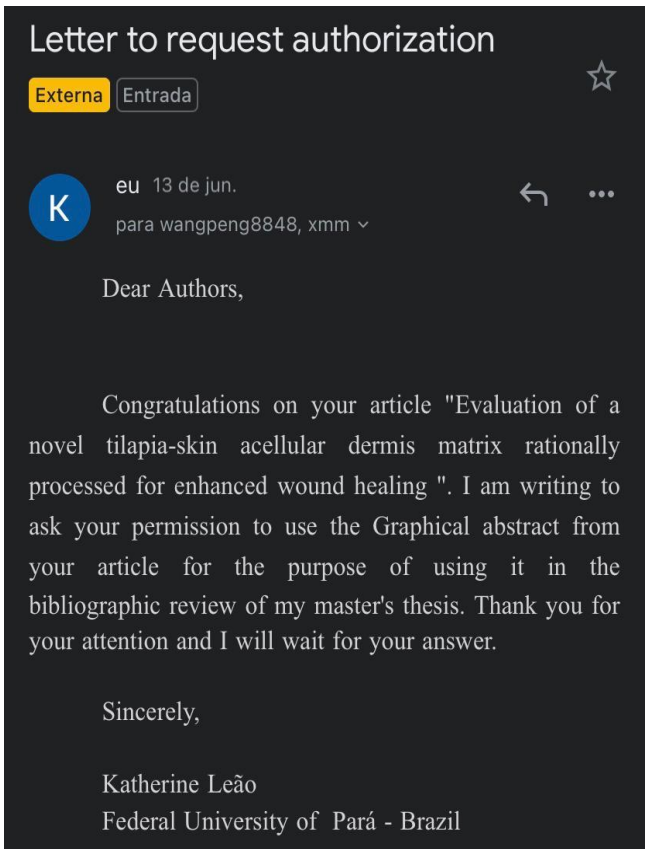
eu 13 de jun.
para erfanrezvani

Dear Authors,

Congratulations on your article "Collagen-based biomaterials for biomedical applications" I am writing to ask your permission to use figure 2 from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Please complete and return this form to me at your earliest convenience

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil



Letter to request authorization

Externa Entrada

eu 13 de jun.
para wangpeng8848, xmm

Dear Authors,

Congratulations on your article "Evaluation of a novel tilapia-skin acellular dermis matrix rationally processed for enhanced wound healing ". I am writing to ask your permission to use the Graphical abstract from your article for the purpose of using it in the bibliographic review of my master's thesis. Thank you for your attention and I will wait for your answer.

Sincerely,

Katherine Leão
Federal University of Pará - Brazil