



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIA DO LIVRAMENTO LINHARES RODRIGUES MENEZES

**HIDROGÉIS DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PELE DE TILÁPIA DO NILO COM
POTENCIAL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS**

FORTALEZA

2020

MARIA DO LIVRAMENTO LINHARES RODRIGUES MENEZES

HIDROGÉIS DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PELE DE TILÁPIA DO NILO COM
POTENCIAL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- M512h Menezes, Maria do Livramento Linhares Rodrigues.
Hidrogéis de colágeno extraído de pele de tilápia do Nilo com potencial aplicação na engenharia de tecidos. / Maria do Livramento Linhares Rodrigues Menezes. – 2020.
105 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.
1. Tilápia do Nilo. 2. Delineamento experimental. 3. Colágeno ASC. I. Título.

CDD 540

MARIA DO LIVRAMENTO LINHARES RODRIGUES MENEZES

HIDROGÉIS DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PELE DE TILÁPIA DO NILO COM
POTENCIAL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 27/05/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Men de Sá Moreira de Sousa Filho
Embrapa Agroindústria Tropical

Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Fábria Karine Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, ao Ollie, ao meu esposo e
minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui.

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

Aos meus pais: Pedro e Francisca, por terem me ajudado e me dado todo apoio nos momentos mais difíceis. Ao meu marido, Bruno pelos conselhos, amizade, cumplicidade durante esse período de minha vida. As minhas irmãs: Flávia, Marcela e Aline pelo apoio e ajuda. Aos meus sobrinhos Ana Livia e João Pedro, e ao meu filho de quatro patas: Ollie. Agradeço a cada um deles pelos momentos de descontração (risos).

Ao meu cunhado, Dudu, pelas palavras de motivação sempre que pensei em desistir.

À minha orientadora Judith Feitosa, pela ajuda nos momentos mais difíceis e pelos sábios ensinamentos.

Ao meu co-orientador: Men de Sá por ter me ajudado nesta etapa. Agradeço pelos conselhos.

As minhas amigas Gabi e Niedja, por terem deixado os dias mais leves durante essa árdua jornada.

Aos meus colegas do Laboratório de tecnologia da biomassa.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto "Ações estruturantes e inovação para o fortalecimento de cadeias produtivas da aquicultura no Brasil "(BRSAqua).

A Embrapa Agroindústria Tropical e ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa pela estrutura dada para que a pesquisa fosse desenvolvida.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) por ter sido minha escola durante todos esses 13 anos

Agradeço a Dra. Flávia Abreu pelo desenvolvimento da análise estatística.

A Dra Fábria e Dra. Niedja pelas análises de citotoxicidade, ao Dr. Adriano e Hálison pelas análises reológicas.

“Nunca desista de seus objetivos, mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.” (Albert Einstein).

RESUMO

A pele de tilápia do Nilo tem sido um grande desperdício nas indústrias de processamento de pescado, com isso, uma alternativa para a valorização desse subproduto é a extração de colágeno, que possui um alto valor agregado para aplicações biomédicas. A extração de colágeno foi realizada sob diferentes condições de reação (tempo, temperatura e concentração de ácido acético), a fim de otimizar o rendimento sem comprometer a integridade do colágeno. A temperatura e o tempo foram responsáveis pelo aumento do rendimento. A extração a 4 °C (Col-4) e 20 °C (Col-20) produziu o colágeno solubilizado em ácido (ASC) com a tripla hélice intacta que foi confirmada pela análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e dicroísmo circular (CD). Col-4 e Col-20 também foi caracterizado quanto ao teor de hidroxiprolina, grau de recuperação e temperatura de desnaturação por viscosimetria. O colágeno ASC obtido nas condições otimizadas (que utilizou 0,35 mol / L de ácido acético a 20 ° C/tempo de 65 horas) foi usado para obter pela primeira vez hidrogéis à base de colágeno de resíduos de pescado com ácido hialurônico (AH), reticulado com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). Os hidrogéis foram obtidos utilizando diferentes razões de concentração dos reticulantes (EDC e NHS) e foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), reologia, grau de intumescimento, degradação enzimática, FT-IR, Calorimetria exploratória Diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA). O hidrogel com maior eficiência de reticulação apresentou uma rede organizada robusta, com aumento de 255% em PBS e interconectados com diâmetro na faixa de 10 a 100 µm. Ao melhor hidrogel foi incorporado timol em diferentes concentrações (0,25-0,5 e 1%). Os hidrogéis incorporados com timol foram caracterizados por atividade antimicrobiana, atividade antioxidante e citotoxicidade. Os hidrogéis reticulados com EDC e NHS apresentaram viabilidade celular aprimorada, indicando o seu uso seguro para a área biomédica, no entanto os hidrogéis Col-AH-Timol_0,25 e Col-AH-Timol_0,5 não apresentaram atividade antimicrobiana, já o hidrogel Col-AH-Timol_1,0 apresentou atividade antimicrobiana, porém, apresentou uma viabilidade celular reduzida.

Palavras-chave: Tilápia do Nilo. Delineamento experimental. Colágeno ASC. Reticulação. EDC/NHS. Hidrogéis.

ABSTRACT

Nile tilapia skin, an abundant waste from fish processing, can be used for collagen extraction, which has a high aggregated value for biomedical applications. Collagen extraction was conducted under different reaction conditions (time, temperature, and concentration of acetic acid) in order to optimize the yield without compromising the integrity of the collagen. Temperature and time were responsible for increased yield. The extraction at 4 °C (Col-4) and 20 °C (Col-20) produced the acid-solubilized collagen (ASC) with the intact triple helix and was analysed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and circular dichroism (CD). Col-4 and Col-20 was also characterized by hydroxyproline, degree of recovery and temperature of denaturation by viscometry. The collagen obtained in the optimized reaction conditions (which used 0.35 mol/L of acetic acid at 20 °C and time 65 hours) was used to obtain for the first-time fish-based hydrogels with hyaluronic acid (HA) crosslinked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). The hydrogels were obtained using different concentration ratios of the crosslinkers (EDC and NHS) and were characterized by scanning electron microscopy (SEM), rheology, degree of swelling, enzymatic degradation, FT-IR, Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA). The hydrogel with the highest crosslinking efficiency presented a robust organized network, swells 255% in PBS and bears interconnected pores with a diameter in the range of 10-100 µm. The best hydrogel was incorporated with thymol in different concentrations (0.25-0.5 and 1%). Hydrogels incorporated with thymol were characterized by antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity and FT-IR. The hydrogels of Col-AH-Timol_0.25 and Col-AH-Timol_0.5 did not show antimicrobial activity. The hydrogel Col-AH-Timol_1.0 showed antimicrobial activity, however, it showed reduced cell viability. However, the hydrogel reticulated with EDC and NHS showed improved cell viability, indicating its safe use for the biomedical area.

Keywords: Nile tilapia. Experimental design. Collagen ASC. Cross-linker. EDC/NHS. Hydrogels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Produção de peixe no Brasil	22
Figura 2	– Produção de tilápia do Nilo no Brasil	23
Figura 3	– Cidades mais produtoras de tilápia do Nilo no Brasil	24
Figura 4	– Produção de resíduo de pescado	25
Figura 5	– Representação esquemática da estrutura do colágeno: (a) tropocolágeno; (b) cadeia α ; (c) forma de triplete	28
Figura 6	– Estrutura do ácido hialurônico	29
Figura 7	– Reação de reticulação entre proteína e glicosaminoglicano	32
Figura 8	– Fórmula estrutural do timol	33
Figura 9	– Fluxograma geral do projeto	36
Figura 10	– Metodologia da extração do colágeno	34
Figura 11	– Resumo gráfico até a produção do hidrogel	39
Figura 12	– Curva de calibração hidroxiprolina	43
Figura 13	– Formulação dos hidrogéis de colágeno e AH reticulados com EDC e NHS	45
Figura 14	– Espectro de FTIR do colágeno extraído a 4°C e a 20°C	55
Figura 15	– Dicroísmo circular do colágeno extraído a 4°C, 20°C e do colágeno desnaturado (gelatina)	58
Figura 16	– Dicroísmo circular em função da temperatura	59
Figura 17	– Efeito da temperatura sobre a viscosidade de soluções de Col-4 e Col-20 .	61
Figura 18	– Teor de hidroxiprolina e grau de recuperação do Col-4 e Col-20	63
Figura 19	– Efeito do pH sobre o potencial zeta de soluções aquosas de colágeno 20 °C e o ácido hialurônico	66
Figura 20	– Mecanismo da reação de reticulação	68
Figura 21	– Efeito do tempo sobre as propriedades reológicas das misturas de Col-20 e AH em diferentes concentrações do reticulante	69
Figura 22	– Gráfico de G' e G'' versus tensão para os hidrogéis de Col-AH reticulados (pré-formados)	70
Figura 23	– Efeito do tempo de imersão sobre o grau de intumescimento dos hidrogéis em tampão PBS	71
Figura 24	– Cinética de degradação enzimática com collagenase para os hidrogéis	73

Figura 25 – Espectro de FTIR para hidrogéis com diferentes concentrações de reticulante	75
Figura 26 – Reação entre EDC (carbodiimida) e NHS	77
Figura 27 – Análise de DSC do colágeno e dos hidrogéis Col-AH reticulados com EDC/NHS	78
Figura 28 – Análise termogravimétrica para o colágeno, AH e para os hidrogéis em atmosfera oxidativa	79
Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis (a) Col-AH sem reticulante, (b) HCAH_40-20, (c) HCAH_40-40, (d) HCAH_80-20, (e) HCAH_80-40	83
Figura 30 – Atividade antimicrobiana para patógenos E. coli de HCAH 80-40 incorporado com timol	86
Figura 31 – Atividade antimicrobiana para patógenos S. aureus de HCAH 80-40 incorporado com timol	87
Figura 32 – Atividade antimicrobiana para patógenos S. cerevisiae de HCAH 80-40 incorporado com timol	88
Figura 33 – Atividade antioxidante do hidrogel Col-AH com diferentes concentrações de timol	89
Figura 34 – Viabilidade celular dos hidrogéis de HCAH 80-40 com diferentes concentrações de timol em células de L929 (fibroblastos de rato)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^3 para a extração do colágeno	37
Tabela 2 – Concentração de EDC e NHS utilizada na formulação dos hidrogéis e resultado da análise reológica	40
Tabela 3 – Delineamento experimental do colágeno extraído de pele de tilapia do Nilo sob diferentes condições de reação	52
Tabela 4 – ANOVA soma quadrática, graus de liberdade e análise de variância (IC 95%) para extração de colágeno	53
Tabela 5 – Análise de regressão linear para a extração do colágeno (p-valor < 0.05) ..	54
Tabela 6 – Atribuições das bandas do espectro de FTIR do colágeno de pele de Tilápia do Nilo	57
Tabela 7 – Concentração entre as características dos colágenos de pele de Tilápia do Nilo extraídos nas temperaturas de 4 e 20 °C	64
Tabela 8 – Eventos da análise termogravimétrica	81
Tabela 9 – Halo de inibição da análise antimicrobiana	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Hidrogéis para engenharia de tecidos	20
3.2	Pescado como fonte de colágeno	21
3.3	Colágeno	25
3.4	Ácido Hialurônico	28
3.5	Reticulação de proteínas e glicosaminoglicanos	30
3.6	Timol (2-isopropil-5-metilfenol)	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Extração do colágeno solúvel em ácidos (ASC) a partir das peles de Tilápia do Nilo	35
4.2	Planejamento Fatorial e Análise Estatística	38
4.3	Preparação dos hidrogéis de colágeno e ácido hialurônico reticulados com EDC e NHS	40
4.4	Preparação dos hidrogéis de COL-AH incorporados com timol	41
4.5	Caracterizações	41
4.5.1	<i>Caracterização do colágeno obtido no delineamento experimental</i>	41
4.1.2.1	<i>Rendimento</i>	41
4.1.2.2	<i>Espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de Fourier</i> ...	42
4.5.2	<i>Caracterização do colágeno 4 e 20 °C</i>	42
4.5.2.1	<i>Discreísmo circular</i>	42
4.5.2.2	<i>Determinação da temperatura de desnaturação por viscosimetria</i>	42
4.5.2.3	<i>Análise de Hidroxiprolina e recuperação</i>	43
4.5.3	<i>Caracterização dos hidrogéis de colágeno e AH</i>	46
4.5.3.1	<i>Potencial Zeta (ζ) da solução de colágeno e de AH</i>	46
4.5.3.2	<i>Análise Reológica</i>	46
4.5.3.3	<i>Grau de intumescimento</i>	46
4.5.3.4	<i>Degradação Enzimática</i>	47

4.5.3.5	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	48
4.5.3.6	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....</i>	48
4.5.3.7	<i>Análise Termogravimétrica (TGA).....</i>	48
4.5.3.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	48
4.5.4	<i>Caracterização dos hidrogéis de col-AH incorporados com timol.....</i>	48
4.5.4.1	<i>Atividade antimicrobiana.....</i>	48
4.5.4.2	<i>Atividade antioxidante.....</i>	49
4.5.4.3	<i>Análise de viabilidade celular.....</i>	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Avaliação da extração do colágeno sob diferentes condições.....	52
5.2	Caracterização do colágeno (ASC) 4 °C e 20 °C.....	55
5.2.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	55
5.2.2	<i>Discrepância circular.....</i>	58
5.2.3	<i>Determinação da temperatura de desnaturação por viscosimetria.....</i>	61
5.2.4	<i>Análise de Hidroxiprolina e recuperação.....</i>	63
5.2.5	<i>Comparação entre os colágenos extraído a 4 e 20 °C.....</i>	65
5.3	Caracterização de hidrogéis de colágeno e ácido hialurônico com diferentes concentrações de EDC e NHS.....	65
5.3.1	<i>Potencial Zeta (ζ) da solução de colágeno e de AH.....</i>	65
5.3.2	<i>Análise Reológica.....</i>	67
5.3.2.1	<i>Durante a reticulação.....</i>	67
5.3.2.2	<i>Após a reticulação.....</i>	70
5.3.3	<i>Grau de intumescimento.....</i>	71
5.3.4	<i>Degradação Enzimática.....</i>	73
5.3.5	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	74
5.3.6	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....</i>	76
5.3.7	<i>Análise Termogravimétrica (TGA).....</i>	79
5.3.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	82
5.4	Caracterização dos hidrogéis de col-AH incorporados com timol.....	84
5.4.1	<i>Atividade antimicrobiana.....</i>	84

5.4.2	<i>Atividade antioxidante</i>	89
5.4.3	<i>Análise de viabilidade celular</i>	90
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94