



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFIGÊNIA MARIA DE SOUSA

**ANÁLISE *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
BIOCOMPÓSITOS DE GELATINA E HIDROXIAPATITA DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

SOBRAL

2020

EFIGÊNIA MARIA DE SOUSA

ANÁLISE *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
BIOCOMPÓSITOS DE GELATINA E HIDROXIAPATITA DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.
Linha de pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva.

SOBRAL

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)

- S696a Sousa, Efigênia Maria.
Análise in vivo da biocompatibilidade e biodegradação de biocompósitos de gelatina e hidroxiapatita de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) / Efigênia Maria Sousa. – 2020.
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva. .
1. Colágeno. 2. Durapatita. 3. Materiais biocompatíveis. 4. Tela Subcutânea. I. Título.
- CDD 660.6
-

EFIGÊNIA MARIA DE SOUSA

ANÁLISE *IN VIVO* DA BIOCAMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
BIOCOMPÓSITOS DE GELATINA E HIDROXIAPATITA DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do Ceará, Campus de
Sobral, como requisito final para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Linha de pesquisa: Análises Integrativas de
Sistemas Biológicos.

Aprovada em: 07/05/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Vieira da Silva Neto (Examinador interno)
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. Jacques Antonio Cavalcante Maciel (Examinador externo)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Ao meu esposo, Miqueias Almeida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar-me saúde, coragem, perseverança e maturidade para eu aproveitar cada momento de aprendizado.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio (código 001).

Ao Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva, pela orientação na minha formação acadêmica.

Ao meu esposo Miqueias Almeida pelo companheirismo, respeito, paciência, compreensão e ajuda ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Manoel Luiz Sousa e Luisa Maria de Sousa, que estão no plano espiritual, mas que merecem toda a minha gratidão, por todos os ensinamentos morais, éticos educacionais e, principalmente, por me terem ensinado a importância da paciência, da sabedoria no saber ouvir e silenciar.

Às minhas irmãs e irmãos, pelos momentos de partilha para meu crescimento pessoal.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, que ultrapassam as dificuldades existentes para exercer suas atividades, sem perder a motivação em nos ajudar quando necessário.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Luiz Vieira da Silva Neto e Dr. Jacques Antonio Cavalcante Maciel, pelo tempo, pela as valiosas colaborações e sugestões para o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos colegas de Iniciação Científica do Grupo de Estudo em Morfologia Yasmin, Lara, Maryane e Anderson, pelo o esforço e dedicação para que o trabalho se desenvolvesse da melhor maneira possível.

Aos pesquisadores e professores: Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho e a Mestra Edla Ferreira Melo, pelo desenvolvimento do material em estudo e parceria científica com o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Aos meus colegas Jesus, Fábio, Sandro, Haydee, Lana e Valdicélio, por todas as colaborações diretas e indiretas para esta pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, pela formação humana e profissional concedida.

A todos os cidadãos brasileiros que contribuíram por meio de seus impostos para que esta pesquisa se tornasse possível.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4, 13.

RESUMO

A indústria da piscicultura brasileira gera subprodutos em grande escala, permitindo a extração de colágeno e hidroxiapatita, o que desperta interesse biotecnológico para o desenvolvimento de dispositivos médico-odontológicos implantáveis para a regeneração óssea. Esse modelo de utilidade é ainda inexplorado para a fonte piscícola. O objetivo desta pesquisa foi analisar a biocompatibilidade e biodegradação de biocompósitos extraídos da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). Pele e escamas de tilápia, originária de Fortaleza-CE, permitiram a extração de hidroxiapatita e gelatina de colágeno. Biocompósitos com diferentes concentrações de gelatina (G) e hidroxiapatita (HA) foram formulados, reticulados com riboflavina e liofilizados: 60%G:40%HA (G1), 70%G:30%HA (G2) e 80%G:20%HA (G3). Após validação de testes físico-químicos, os materiais seguiram para testes biológicos pré-clínicos. Análise *in vivo* utilizou 30 camundongos Swiss, machos adultos, sendo 15 submetidos à enxertia subcutânea com G1, G2 e G3 e outros 15 com membrana colágena comercial (C+) ou cirurgia sem enxerto (C-). Necrópsias dos tecidos subcutâneos em 1, 3 e 9 semanas foram processadas e incluídas em parafina. Cortes histológicos permitiram análise semiquantitativa por pontuações de critérios inflamatórios (neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas) e de reparo (neovascularização, tecido conjuntivo) conforme a norma ISO 10993-6, permitindo definição da escala de biocompatibilidade de cada material. A biodegradação também foi validada em análise semiquantitativa por pontuações segundo a integridade de cada material. A análise estatística dos dados não paramétricos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com $p < 0,05$. Como resultados, G1 foi pouco irritante até 9 semanas, enquanto G2 e G3 foram pouco irritantes até 3 semanas e não irritantes em 9 semanas, similares ao C+. Entre 1 e 9 semanas, houve, em todos os grupos, a diminuição de: critérios inflamatórios, apesar de a persistência de células gigantes em 9 semanas ser maior em G3 seguida por G1 e G2 frente a C+ e C-; neovascularização; e integridade dos materiais, com maior presença de G1 do que G3 frente a C- e menor presença de G2 frente a C+. Ao longo desse período, só houve aumento constante do tecido conjuntivo, mais abundante em 9 semanas em G1 frente a C+ e C- e G2 para C+. Embora todos os materiais de tilápia tenham sido biocompatíveis e parcialmente biodegradáveis, G1 sugere maior potencial de uso como barreira de membrana em procedimentos clínicos, com seu desempenho biológico associado à maior concentração mineral frente à fase orgânica no biocompósito.

Palavras-chave: Colágeno. Durapatita. Materiais biocompatíveis. Tela Subcutânea.

ABSTRACT

The Brazilian fish farming industry generates by-products on a large scale that allow the extraction of collagen and hydroxyapatite. The natural origin awakens biotechnological interest in the development of implantable medical and dental devices for bone regeneration. This utility model is still unexplored for the fish source. The objective of this research was to analyze the biocompatibility and biodegradation of biocomposites extracted from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Skin and scales of tilapia from Fortaleza-CE allowed the extraction of hydroxyapatite and collagen gelatin. Biocomposites with different concentrations of gelatin (G), hydroxyapatite (HAp) were formulated, cross-linked with riboflavine and lyophilized: 60%G:40% HA (G1), 70%G:30% HA (G2) and 80%G:20%HA (G3). After validation by physical-chemical tests, the materials followed for pre-clinical biological tests. In vivo analysis used 30 adult males Swiss mice, 15 of whom submitted to subcutaneous grafting with G1, G2 and G3 and another 15 with commercial collagen membrane (C +) or surgery without graft (C-). Necropsies of subcutaneous tissues at 1, 3 and 9 weeks were processed and embedded in paraffin. Histological sections allowed semi-quantitative analysis by scores of inflammatory criteria (neutrophils, lymphocytes, macrophages, multinucleated giant cells) and repair (neovascularization, connective tissue) according to ISO 10993-6, allowing the definition of the biocompatibility scale of each material. Statistical analysis of nonparametric data was performed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, with $p < 0.05$. As a result, G1 was mildly irritating up until 9 weeks, while G2 and G3 were mildly irritating up to 3 weeks and non-irritating up to 9 weeks, similar to C +. Between 1 and 9 weeks, there was a decrease about: inflammatory criteria, despite the persistence of giant cells in 9 weeks being bigger in G3 followed by G1 and G2 against C + and C-; neovascularization; and material integrity, with a bigger presence of G1 than G3 against C- and less presence of G2 against C +. During this period, there was only a constant increase in connective tissue, more abundant in 9 weeks in G1 compared to C + and C- and G2 for C +. Although all tilapia materials have been biocompatible and partially biodegradable, G1 suggests greater potential for use as a membrane barrier in clinical procedures, with their biological performance associated with greater mineral concentration compared to the organic phase in the biocomposite.

Key words: Collagen. Durapatite. Biocompatible materials. Subcutaneous Tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tripla helicoidal da molécula de colágeno e seus resíduos de aminoácidos.....	22
Figura 2	Processo de formação, organização e estruturação da fibra de colágeno.....	23
Figura 3	Estrutura cristalina da hidroxiapatita.....	25
Figura 4	Estrutura hierárquica da matriz óssea humana em várias escalas de comprimento.....	26
Figura 5	Ilustração das reações celulares aos biomateriais à base de colágeno de suínos em modelo de implantação subcutânea em um período de 60 dias. A- Reação caracterizada por células mononucleares e polimorfonucleares. B- Reação caracterizada por células gigantes multinucleadas.....	29
Figura 6	Respostas da interação hospedeiro-biomaterial pós implantação.....	31
Figura 7	(A) Os três biocompósitos: G1, G2 e G3 (B) Implante subcutânea das amostras em camundongos.....	41
Figura 8	Fotomicrografia de G1, G2, G3, C+ e C- implantado em tecido subcutâneo de camundongos em 1, 3, 9 semanas. *Material implantado. Barra de escala: 20µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 1600x. Barra de escala: 20µm.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Dados da produção nacional de *O. niloticus* segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatístico (IBGE) nas regiões Centro-oeste, Sul, Sudeste, Nordeste e Norte, em 2017..... **19**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Análise semiquantitativa do padrão de irritação de G1, G2, G3 e C+ em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais segundo a ISO 10993-6 (2007)..... 46
- Tabela 2** Análise semiquantitativa dos critérios inflamatórios de G1, G2, G3, C+ e C- em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição..... 47
- Tabela 3** Análise semiquantitativa dos critérios reparativos (angiogênese ou neovascularização e tecido conjuntivo ou fibrose) de G1, G2, G3, C+ e C- em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição..... 48
- Tabela 4** Análise semiquantitativa da biodegradação de G1, G2, G3, C+ e C- em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura
MEC	Matriz extracelular
RER	Retículo endoplasmático rugoso
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
BIOCEN	Biotério Central da Universidade Federal do Ceará
G	Gelatina
HA	Hidroxiapatita
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CNPAT	Centro Nacional de Pesquisa em Agroindústria Tropical
TGA/DTG	Análise Termogravimétrica e sua derivada
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
MEV	Microscopia Eletrônica por Varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
DRX	Difração de Raio-X
ISO	International Standard Organization
UFC	Universidade Federal do Ceará
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
ROG	Regeneração Óssea Guiada

LISTA DE SÍMBOLOS

$P \leq 0,05$	Probabilidade de erro menor que 5%
%	Porcentagem
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
mm^2	Milímetros elevado ao quadrado
ml	Mililitros
Kg	Kilogramas
mg	Miligramas
cm	Centímetros
cm^2	Centímetro elevado ao quadrado
©	Copyright
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Panorama de pescado.....	18
2.2	Biomateriais.....	20
2.2.1	Colágeno e gelatina.....	21
2.2.2	Bio-hidroxiapatita.....	24
2.3	Biodegradação e biocompatibilidade.....	27
2.4	Dinâmica do processo inflamatório.....	29
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS.....	34
4.1	Objetivo Geral.....	34
4.2	Objetivos Específicos.....	34
5	MANUSCRITO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICE A - DESENHO EXPERIMENTAL DO ENSAIO DE IMPLANTAÇÃO À NECRÓPSIA.....	67
	APÊNDICE B - SEQUÊNCIA DOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DOS MATERIAS TESTES.....	68
	APÊNDICE C- ETAPAS DOS PROCEDIMENTOS DE NECRÓPSIA EXCISIONAL.....	69
	APÊNDICE D - RESPOSTA DA AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS PARA O TEMPO EXPERIMENTAL DE 1 SEMANA.....	70
	APÊNDICE E - RESPOSTA DA AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS PARA O TEMPO EXPERIMENTAL DE 3 SEMANAS.....	71

APÊNDICE F - RESPOSTA DA AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS PARA O TEMPO EXPERIMENTAL DE 9 SEMANAS.....	72
ANEXO A – DIRETRIZES PARA AUTORES – PERIÓDICOS QUALIS CAPES A3.....	73
ANEXO B – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 4 DE JUNHO DE 2019.....	80
ANEXO C – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA, UFC)	81
ANEXO D – AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA POR PARÂMETROS DE PONTUAÇÃO (COM PEQUENAS MODIFICAÇÕES BASEADAS NA ISO 10993-6, 2007) PARA AVALIAÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA, REPARATIVO, INTEGRIDADE DOS ENXERTOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS.....	82
ANEXO E – AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCOMPATIBILIDADE (COM PEQUENAS MODIFICAÇÕES BASEADAS NA ISO 10993-6, 2007) DOS ENXERTOS EM MODELO SUBCUTÂNEO	83
ANEXO F – INSTRUÇÕES PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO (PPGB).....	84
ANEXO G – PADRÃO DE CITAÇÃO DA AFILIAÇÃO INSTITUCIONAL.....	85
ANEXO H – PARECER DE CONFORMIDADE DA LÍNGUA PORTUGUESA DA VERSÃO FINAL PARA DEFESA DA DISSERTAÇÃO.....	86

1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro abriga a maior biodiversidade do planeta, possuindo os maiores corpos hídricos. Logo, os ecossistemas aquáticos possuem uma grande variedade de espécies de peixes, responsáveis por grande parte da movimentação do setor econômico e alimentício (ORLANDI-NETO et al., 2019; POLAZ; RIBEIRO, 2017; AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005).

Há algumas décadas, a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vem sendo listada como uma das espécies mais produzidas globalmente, devido às suas características de rápido crescimento, fácil reprodução, adaptação e socialização com outras espécies, bem como por sua carne palatável, rica em proteínas, minerais e lipídeos saudáveis (LIU et al., 2019; FARZAD et al., 2019; LUSTOSA-NETO et al., 2018).

Nesse contexto, sabe-se que a produção de pescado gera resíduos como: cabeças, vísceras, nadadeiras, caudas, vértebras, barbatanas, escamas, peles e restos de carnes. Tais resíduos podem ser utilizados como fontes de matéria-prima para pesquisa científica, visto que diversos estudos indicam componentes orgânicos e inorgânicos valiosos nas escamas de peixes, como, por exemplo, o colágeno e os cristais de hidroxiapatita. Tais exemplos vêm demonstrando uma crescente capacidade de bioprospecção na confecção de biomateriais, assim como vêm contribuindo com a redução dos descartes no meio ambiente, ajudando na manutenção do mesmo (ILYAS et al., 2018; SU et al., 2017; PINTO et al., 2017; VILLAMIL et al., 2017; HALIM et al., 2016, FANG et al., 2014).

O termo biomaterial foi, primeiramente, definido por Williams, em 1999, como uma ou mais substâncias em combinação, de origem natural ou sintética usado durante qualquer tempo, para substituir parcial ou integralmente tecidos, órgãos ou funções corporais. Desde então, observou-se um grande salto tecnológico na busca por materiais biocompatíveis e biodegradáveis e, de acordo com a evolução científica, tornou-se possível o proporcionamento de uma melhor qualidade de vida aos pacientes, reduzindo o sofrimento físico e psicológico (KHORRAMIROUZ et al., 2018; HARRIS; LU; GABRIELE, 2018; MATA et al., 2017; MAIA et al., 2010).

Por conseguinte, surgiram diversos estudos e investimentos no ramo de materiais implantados e suas técnicas de fabricação, principalmente, no ramo da engenharia de tecidos dentários e ortopédicos, visando a repor e a sobrepor tecidos lesionados, perdidos em decorrência de doenças crônicas ou progressivos traumas e lesões no sistema musculoesquelético. Posto isso, revistas científicas expõem excelentes resultados, inclusive na

capacidade de recuperação morfofuncional do tecido lesado, alcançando, pois, um aumento na expectativa de vida, juntamente com uma melhor qualidade. Sendo assim, o uso de biomateriais como enxertos para o reparo tecidual demonstrou-se uma alternativa promissora na área da saúde (SOUSA et al., 2019; CAMPOS-JÚNIOR et al., 2016; SANTOS et al., 2016; BITTENCOURT et al., 2014; CARVALHO et al., 2010; AVÉS et al., 2008).

Dessa forma, houve um amplo crescimento em relação aos estudos dos biomateriais ricos em bioapatita e colágeno. Com base no citado, a bioapatita mostra-se biomimética à matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo humano e o colágeno uma notável macromolécula em muitas pesquisas. Nessas análises, foi demonstrada com eficácia a agregação de moléculas de colágeno-bioapatita, sendo observada sua importância na estrutura e função dos tecidos, seu baixo potencial inflamatório e uma excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Essas características são fundamentais nos arcabouços naturais, pois evitam uma possível rejeição, toxicidade ou necrose, além de promoverem uma resposta inflamatória controlada, por meio da quimiotaxia das células, mecanismo responsável pela ativação das células reconhecedoras de corpo estranho, resultando em uma rápida biodegradação do material enxertado (SIVARAMAN; MUTHUKUMAR; SHANTHI, 2019; ERMITA et al., 2018; CARVALHO et al., 2018; GROSSI et al., 2016; JARDELINO et al., 2010).

Do mesmo modo, vários biomateriais têm sido utilizados para a confecção de arcabouços, visando a uma possível utilização futura na forma de enxertos, sejam de origem biológica ou sintética. Sabe-se que diversos biomateriais são aplicados às ciências médicas na forma de enxertos autólogos, alógenos, xenógenos e aloplásticos. O enxerto autólogo é considerado uma técnica segura, eficaz, reconhecida como “padrão ouro”, na qual, o próprio indivíduo é o doador e receptor. Já nos enxertos alógenos, os doadores são da mesma espécie dos receptores. Em contraste, nos enxertos xenógenos, os doadores são de espécies diferentes às espécies dos receptores e os enxertos aloplásticos são materiais sintéticos de grande disponibilidade que dispensam a realização de um procedimento cirúrgico de um sítio doador (MIRANDA, 2018; FATTAHIAN et al., 2017; CASTRO-SILVA; LIMA; GRANJEIRO, 2014; MAIA et al., 2010).

A pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido citada como um biomaterial no reparo tecidual, devido à sua boa aderência aos ferimentos em animais e à sua comprovada eficiência como curativo biológico, sendo amplamente utilizada no tratamento de queimaduras e no reparo de tecido lesado em humanos. Além disso, ela possui funções antimicrobianas, obtendo potencial de reduzir prováveis sofrimentos físicos no ambiente hospitalar e, conseqüentemente, possíveis agravos expressivos à saúde pública como: gastos

com medicações, curativos diariamente e ocupação de um leito hospitalar por um longo período. Portanto, o colágeno e a gelatina extraídos a partir da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) possuem um grande potencial para aplicação como biomaterial, visando possíveis patentes institucionais, a fim de beneficiar o ser humano (LI et al., 2019; GIMENEZ et al., 2019; MIRANDA; BRANDT, 2019; SENA et al., 2014).

A avaliação dos biomateriais envolve ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo o Órgão Internacional de Padronização (ISO 10993-6) o responsável pela avaliação de testes *in vivo* de diversos produtos implantáveis com a finalidade de reparo ósseo. Conforme diversos estudos, os arcabouços derivados de subprodutos de pescados possuem um potencial biomédico para aplicação da metodologia de enxertia subcutâneo, teste necessário para análise da resposta inflamatória, reatividade imune, capacidade de recelularização e validação da angiogênese (KHORRAMIROUZ et al., 2018; BITTENCOURT et al., 2014; SENA et al., 2014; JARDELINO et al., 2012; LOMELINO et al., 2012; LIMA et al., 2011; PAULO et al., 2011; AVÉS et al., 2008).

Nesse sentido, os camundongos são os animais mais utilizados nas pesquisas biomédicas e elegidos para utilização no presente estudo, devido à facilidade da experimentação *in vivo*, por tratar-se de um mamífero de pequeno porte, dócil, sociável, com um padrão de reatividade tecidual semelhante ao do ser humano, com uma ordem de similaridade genética de 90% e pelo fato de estar de acordo com a norma de avaliação biológica de dispositivos médicos implantáveis (CONCEA, 2019; HUANG et al., 2011; ISO, 2007).

É válido ressaltar que a literatura apresenta uma gama de trabalhos científicos *in vivo* com a utilização de materiais xenoenxertos derivados de resíduos de outras espécies de animais, por meio da combinação de colágeno-HA, os quais reportaram uma boa biocompatibilidade. Portanto, recentemente houve uma expansão para resíduos de pescados, situação que se vislumbra como uma oportunidade biotecnológica e como um excelente modelo de estudo para avaliação dos biocompósitos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), além de contribuir com a mitigação do impacto ambiental. Visto isso, o presente estudo permite a pesquisa da necessidade de caracterização biológica *in vivo* normalizada na ISO, por meio da implantação de biomateriais, visando a um futuro potencial no uso clínico, referente à regeneração óssea (GIMENEZ et al., 2019; GROSSI et al., 2016; KANE et al., 2015; BITTENCOURT et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama de pescado

Em escala mundial, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018) expôs o ano de 2016 com 171 milhões de toneladas, em que a maior parte de toda a produção de peixes é atribuída ao consumo humano e a outra parte, resultado de processamentos de pescado, é atribuída à fabricação de farinhas e óleos de peixes. Nesse contexto, a China é o maior produtor de pescado, que contribuiu com 2 milhões de toneladas e o Brasil é 13º maior produtor de pescado, que contribuiu com 225 mil toneladas. Assim, para o futuro, com essa demanda crescente, globalmente, espera-se melhorias tecnológicas, projetando 201 milhões de toneladas de pescado para 2030.

As primeiras espécies de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram oriundas do continente africano, onde se encontram amplamente distribuídas pelos mais diversos países. No Brasil, foi inserida em 1997, na Região Nordeste pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), para povoar os diversos reservatórios, bem como para incentivar e alargar o cultivo nas demais regiões brasileiras nos variados corpos hídricos e propriedades. A partir de então, as espécies foram adotadas em cultivos intensivos e semi-intensivos (SCHULTER; FILHO, 2017).

Esses cultivos apresentaram excelentes desempenhos e contribuíram com a geração de emprego e renda. Assim, os cultivos podem ser de vários tipos como: pesca extrativista, aquicultura, piscicultura e tilapicultura. A pesca extrativista consiste na criação de pescados no ambiente natural; a aquicultura refere-se à criação de diversos organismos aquáticos em um meio tratado e controlado; a piscicultura refere à criação de peixes de águas doces e marinhas em um meio tratado e controlado, já a tilapicultura é a criação das espécies de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SCHULTER; FILHO, 2017; SANTOS-FILHO et al., 2016).

Nas últimas décadas, a produção de pescado cresceu mundialmente e, mais recentemente, vem ganhando importância no Brasil, especificamente a piscicultura (MATA et al., 2018). Desse modo, as espécies mais produzidas mundialmente são as espécies de carpas e as Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocupando os primeiros lugares e o quarto lugar, respectivamente, de toda a produção de aquicultura (FAO, 2018).

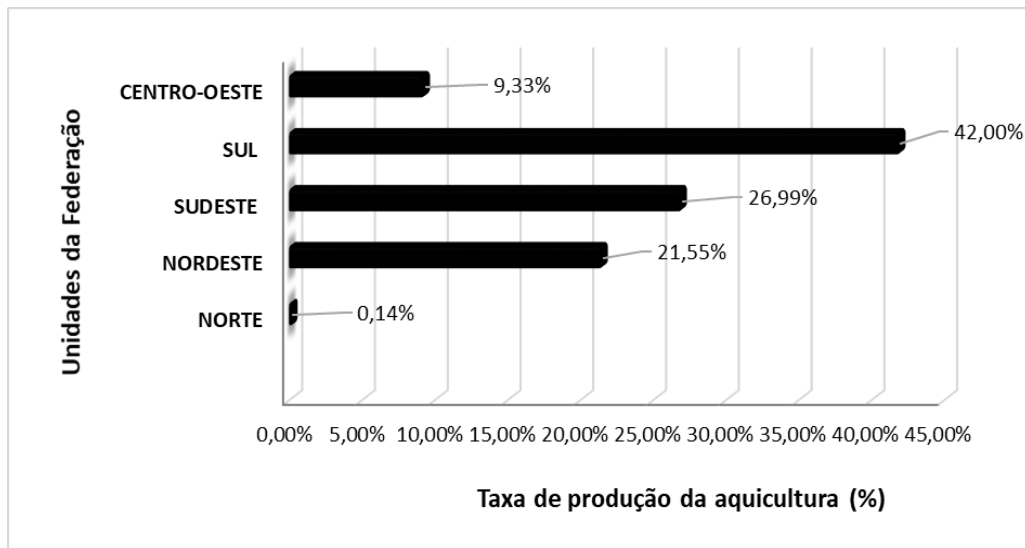
A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie resistente a doenças, de crescimento rápido em regiões tropicais, e de fácil adaptação a diversos meios e a outras

espécies. E essa adaptação deve-se ao seu metabolismo e desempenho produtivo ser influenciado pela temperatura, o que a torna atrativa para sua criação, além de ser uma carne rica em proteínas, em aminoácidos, gorduras saudáveis, vitaminas (D, A e B) e minerais como cálcio, iodo, zinco, ferro e selênio, além de fácil digestão (OLIVEIRA et al., 2017; RAGHIANTE et al., 2017; BANDEIRA; NASCIMENTO, 2017).

O Brasil possui características geográficas que favorecem o crescimento de aquicultura e piscicultura, pois possui um vasto território, tanto de reservatórios de água doce como de uma longa extensão de linha costeira. A região Nordeste contribui com uma grande extensão litorânea de mais de 3.000 km, além de diversos reservatórios, tanques-redes, tanques escavados e poços, porém, como os índices pluviométricos são variáveis, reduz um pouco o potencial do desenvolvimento da aquicultura na região (BANDEIRA; NASCIMENTO, 2017).

Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE 2017, a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais cultivada no território brasileiro e, a cada ano, esse número cresce em relação ao ano anterior. O **Gráfico 1** expõe dados estatísticos do IBGE de 2017, em que a Tilápia do Nilo é uma das espécies mais criadas no território brasileiro, sendo a Região Sul a maior produtora de tilápia com 42,0%, seguida do Sudeste e Nordeste com 26,99% e 21,55%, respectivamente.

Gráfico 1 - Dados da produção nacional de *O. niloticus* segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatístico (IBGE) nas regiões Centro-oeste, Sul, Sudeste, Nordeste e Norte, em 2017.



Fonte: adaptado do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017).

Desse modo, as regiões Centro-Oeste, Sul, Sudeste e Nordeste apresentaram a espécie *O. niloticus* com o maior número de produção, com exceção da região Norte que apresentou a espécie Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ficou no vigésimo segundo lugar de toda a produção de pescado na região.

Assim, o Brasil é 13º maior produtor de pescado em escala mundial e esta característica se deve ao fato de possuir uma enorme diversidade aquática e abundantes recursos hídricos para produção de peixes, porém, necessita de mais aprimoramento tecnológico de acordo com cada região, semelhante aos domínios tecnológicos nas cadeias de produtividade avícolas, suínos e bovinos (MEDEIROS-JÚNIOR; CORDEIRO; SILVA, 2018; ITUASSÚ; ARAGÃO, 2018; BANDEIRA; NASCIMENTO, 2017).

2.2 Biomateriais

Os biomateriais possuem origem antiga e vem ganhando espaço e aperfeiçoamento, por se mostrarem aplicáveis na correção de diversos tipos de problemas relacionados à saúde. Desse modo, os biomateriais vêm sendo definidos de diferentes formas por diferentes autores ao longo dos últimos anos, porém são mais bem definidos como dispositivos implantáveis a um ser vivo com o intuito de reparar em parte ou em um todo. Nesse sentido, os biomateriais compreendem de uma gama de compostos aplicáveis à área da saúde, que se diferem amplamente em função e características estruturais, variando de macromoléculas biológicas naturais a totalmente sintéticos (MOERBECK-FILHO et al., 2019; PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015).

Assim, a medicina regenerativa vislumbra materiais implantáveis, cujo principal critério de qualquer substituto ósseo são a biocompatibilidade, biodegradação e baixa toxicidade, reduzindo as reações inflamatórias, imunológicas e rejeição do enxerto. Neste seguimento, a biocompatibilidade consiste na capacidade de as células aderirem e migrarem para a superfície do biomaterial e, após a implantação, desencadear o mínimo de respostas inflamatório e imunológico em decorrência da rejeição. Já a biodegradação se refere à capacidade de estimular as células a produzir sua própria matriz extracelular. Desse modo, a degradação ocorre em conjunto com a formação de tecido, e, gradualmente, vai sendo substituída por uma nova matriz do tecido interposicionada na região, a mais próxima da existente (MOERBECK-FILHO et al., 2019; FERREIRA, 2016; KAWACHI et al., 2000).

Os biomateriais naturais são comumente chamados de biopolímeros e são bastante utilizados na medicina regenerativa, devido à sua biocompatibilidade, à biodegradação e à

baixa toxicidade. Os biopolímeros mais promissores são: o ácido hialurônico e a quitosana, o colágeno e gelatina. Assim, estudos *in vitro* apresentaram uma boa sinalização biológica e adesão celular. Em complementariedade, experimentos *in vivo* mostraram serem excelentes cicatrizantes e epitelizante, além de controlarem as infecções no estágio primário, reduzirem o crescimento de tecido granular e removerem os detritos necróticos que favorecem o crescimento celular (JACOB et al., 2018; PARK et al., 2017; RAHIMNEJAD; DERAKHSHANFAR; ZHONG, 2017; SALGADO et al., 2016; BASHA; KUMAR; DOBLE, 2015).

Os compósitos são materiais multifásicos formados a partir da combinação de dois ou mais componentes, que podem ser do tipo polímero-cerâmica ou metal-cerâmica. Entretanto, as combinações de componentes orgânicos e inorgânicos estão sendo estudados como biomaterial aplicável, principalmente, abordando o conjunto de bioapatitas e colágeno de várias espécies de animais. Assim, os biocompósitos de colágeno e hidroxiapatita se destacam devido às suas características serem semelhantes aos dois componentes principais da matriz óssea: colágeno e hidroxiapatita (JACOB et al., 2018; ERMITA et al., 2018; SILVA et al., 2017; PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015; CHEN et al., 2015).

Com esses fundamentos, é interessante fazer o aproveitamento dos resíduos de pescados como peles e escamas, utilizando-os como matérias-primas, visto que estudos apontam que o colágeno e hidroxiapatita derivados de pescado são biomimética aos componentes do tecido ósseo humano, podendo ser um excelente modelo de estudo para pesquisa científica. O avanço da biotecnologia possibilitou a aplicação de arcabouços de biocompósitos de hidroxiapatita e gelatina para diversas aplicações na medicina regenerativa, somando-se a isso, o grande interesse do mercado comercial pelos produtos com base no colágeno (LI et al., 2019; NARAYAN et al., 2017; BASHA; KUMAR; DOBLE, 2015; TANG; SAITO, 2015; RIBEIRO et al., 2014).

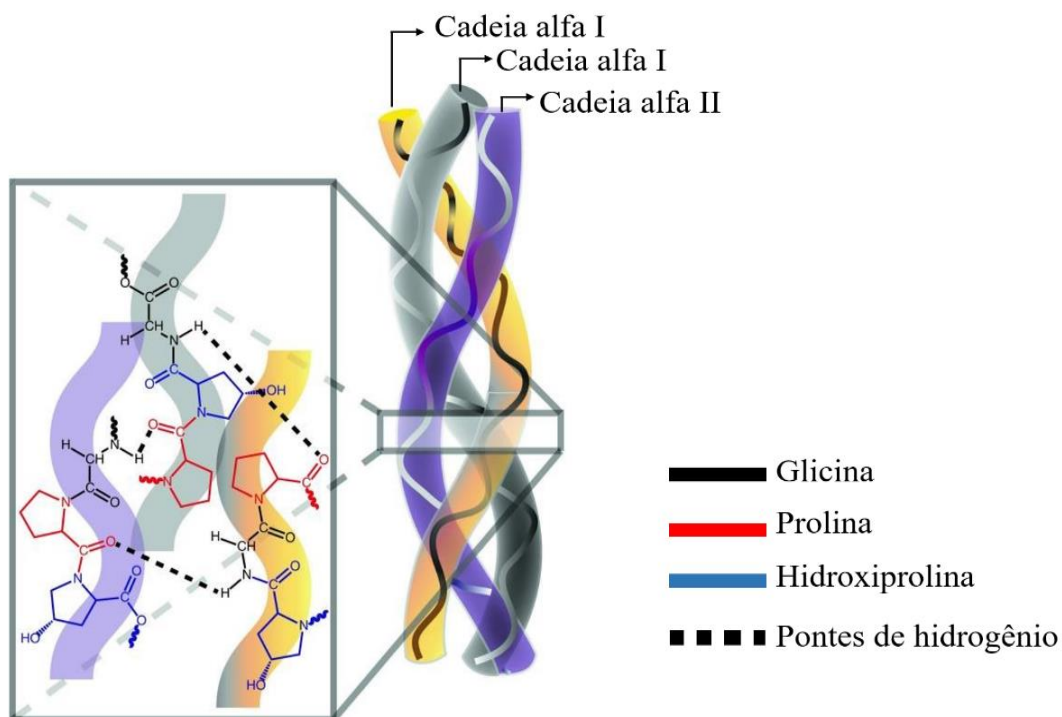
2.2.1 Colágeno e gelatina

O colágeno é um biopolímero natural e considerado a molécula mais aplicada na construção de biomateriais, em virtude da biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser um produto de alto valor comercial. Essas macromoléculas são encontradas abundantemente no tecido conjuntivo dos animais, difundidos em peles, ossos, ligamentos, tendões e cartilagens, bem como em tecidos intersticiais de diversos animais como os bovinos, suínos, caprinos, ovinos, peixes, anfíbios, entre outros. Porém, a extração do

colágeno de tecidos bovinos e suínos é pouco utilizada, devido à possibilidades de transmissão de patógenos, alargando, assim, espaço para peixes e frutos do mar (FELICIAN et al., 2018; KUMAR; RANI, 2017; WANG et al., 2017; BASHA; KUMAR; DOBLE, 2015; ARANHA; BRAGA, 2011).

O colágeno é representado por uma grande família. Segundo a literatura, existem 29 tipos de colágenos conhecidos, que se diferenciam quanto à composição e ao arranjo dos aminoácidos. A **Figura 1** ilustra o colágeno tipo I, que é o mais conhecido e abundante, formado por três cadeias polipeptídicas: duas cadeias alfa I e uma cadeia alfa II. Essas cadeias polipeptídicas são formadas por uma sequência de aminoácidos, tal como a glicina, prolina e hidroxiprolina, embora sejam possíveis outros resíduos de aminoácidos, em que se arranjam em uma estrutura tripla helicoidal e com uma extremidade N-terminal e C-terminal (GULICK et al., 2019; COLE et al., 2018).

Figura 1: Estrutura tripla helicoidal da molecular de colágeno e seus resíduos de aminoácidos.



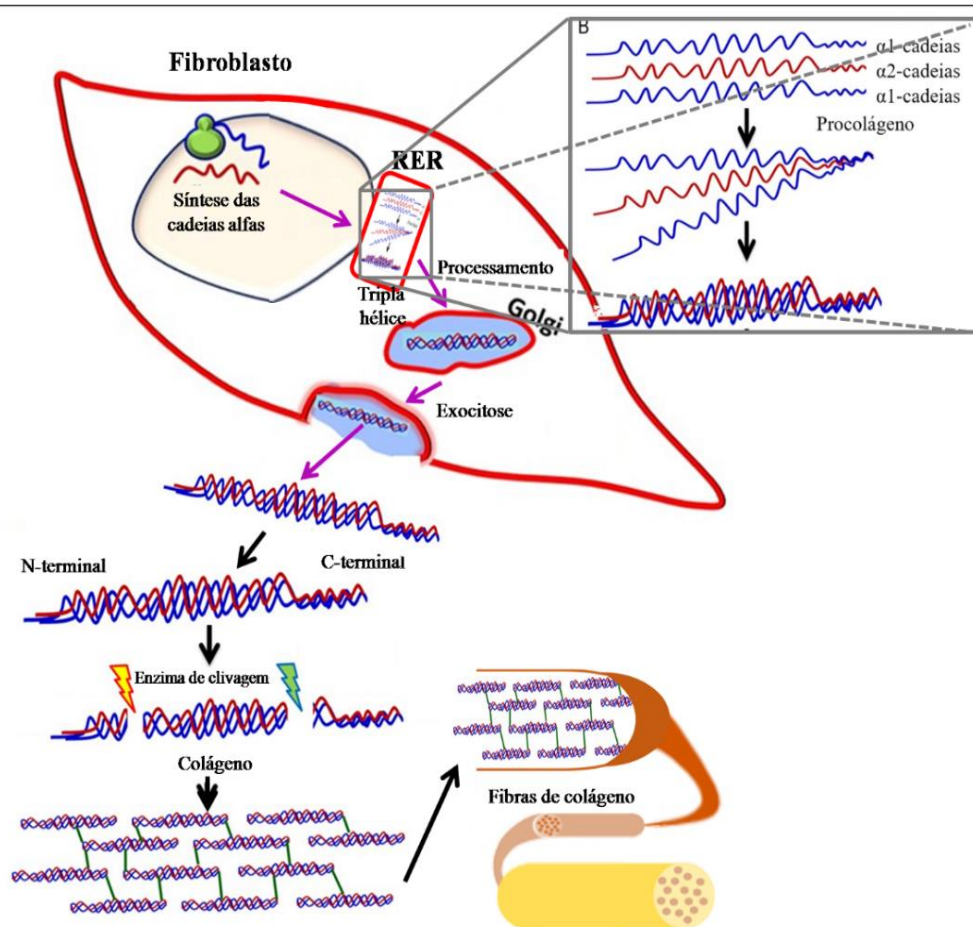
Fonte: adaptado de Cole et al. (2018).

Sendo assim, o colágeno e a gelatina são duas formas diferentes de uma mesma macromolécula, em que o colágeno é uma mistura de aminoácidos essenciais e não-essenciais, e a gelatina é a forma fracionada e hidrolisada do colágeno, que é solúvel em água.

No entanto, as propriedades do colágeno de peixes de águas doces e marinhas podem possuir algumas sequências de resíduos de aminoácidos diferentes, que podem estar relacionadas ao processo de fabricação. Entre os vários resíduos de aminoácidos no colágeno de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), os mais encontrados são: os resíduos de Glicina, Prolina e Hidroxiprolina, que caracteriza ser o colágeno tipo I (SONG et al., 2019; LV et al., 2019; CALDATO; NAVES; ZATTA, 2019; SILVA et al., 2018; OUYANG et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017; EL-RASHIDY et al., 2015).

A **Figura 2** ilustra o processo de biossíntese do colágeno nos fibroblastos, células de origem mesodérmica, presentes em grande número no tecido conjuntivo e com função de garantir o reparo, a regeneração e cicatrização.

Figura 2 - Processo de formação, organização e estruturação da fibra de colágeno.



Fonte: adaptado de Thankam et al. (2018).

O processo de biossíntese de todos os tipos de colágenos é comum para maioria das espécies, em particular o colágeno do tipo I, que se inicia no espaço intracelular com a

transcrição do gene no núcleo celular, com o amadurecimento e montagem da tripla hélice no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER). Durante a síntese pós-traducional, ocorrem várias modificações dependentes de ácido ascórbico (vitamina C), que atuam como cofator para a hidroxilação da prolina e da lisina. Essas cadeias polipeptídicas se arranjam em triplas hélices, com duas cadeias polipeptídicas alfa I e uma cadeia alfa II, e com seus peptídeos registros nitrogênio N-terminal e C-terminal formando o procolágeno. Os procolágenos são, então, transportados para o interior do aparelho de Golgi, que é processado e transportado para membrana plasmática para ser excretado para o espaço extracelular. No meio extracelular, ocorre a clivagem dos peptídeos registros por enzimas proteinases para originar as moléculas de colágeno. Então, para a formação de fibrilas de colágenos, as moléculas de colágenos alinham-se lado a lado por meio de ligações cruzadas intra e intermoleculares do tipo covalente. E seu conjunto compõe as fibras de colágeno que se organizam em feixes (THANKAM et al., 2018; LI et al., 2013; SILVA; PENNA, 2012; KAKU; YAMAUCHI, 2014; GELSE et al., 2003).

Desse modo, o colágeno e a gelatina são constituídos por um conjunto de aminoácidos extraídos de diversos animais. A extração a partir da pele das espécies de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é bastante promissora, principalmente para serem aplicados como barreira protetora de patógenos e reparo de tecido lesado, mostrando ser um excelente curativo biológico, além de ter sido utilizada na vaginoplastia, reconstrução do epitélio vaginal (DIAS et al., 2019; MIRANDA; BRANDT, 2019; ALVES et al., 2018; NUNES; LOPES, 2018). Também, os estudos de Chang e colaboradores (2017) contribuíram com o achado de β -defensina, um peptídeo antimicrobiano, encontrado na pele de Tilápia do Nilo, que atua como um sistema de defesa do hospedeiro contra patógeno.

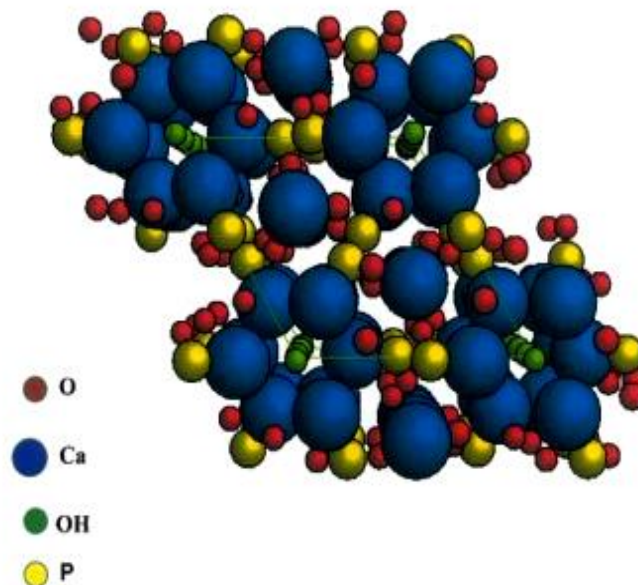
Nesse sentido, a molécula de colágeno derivado dos bioresíduos de pescado é bem comum sere utilizada na alimentação humana e animal na forma de óleos, farinha e ração. Além de se destacar nos estudos científicos pela a biodisponibilidade, biodegradação, ausência de toxicidade, ausência de divergências religiosas, tornando propícip o emprego desses resíduos na foma de biomaterial (LV et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017; GELSE et al., 2003).

2.2.2 Bio-hidroxiapatita

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo composto de duas partes: uma inorgânica e outra orgânica. A parte inorgânica é constituída de nanocristais de hidroxiapatitas, composta

de cálcio, fosfato, oxigênio e grupos de hidroxilas (**Figura 3**) definida e representada pela seguinte fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Neste seguimento, os componentes inorgânicos conferem rigidez e estrutura ao tecido ósseo, além de atuar como reservatório para manter o equilíbrio iônico no corpo vivo. No segmento dos componentes orgânicos, a matriz óssea é representada por proteínas, principalmente o colágeno, que pode variar de acordo com a idade e o gênero, conferindo resistência à tração e ductilidade. Neste contexto, os esqueletos de pescados e escamas contém fosfato de cálcio, colágeno, mostrando-se serem biocompatíveis com os componentes da matriz óssea humana (KEENAN et al., 2019; ZHANG et al., 2018; REIS et al., 2017; LOPES et al., 2015).

Figura 3: Estrutura cristalina da hidroxiapatita



Fonte: Masseli (2018).

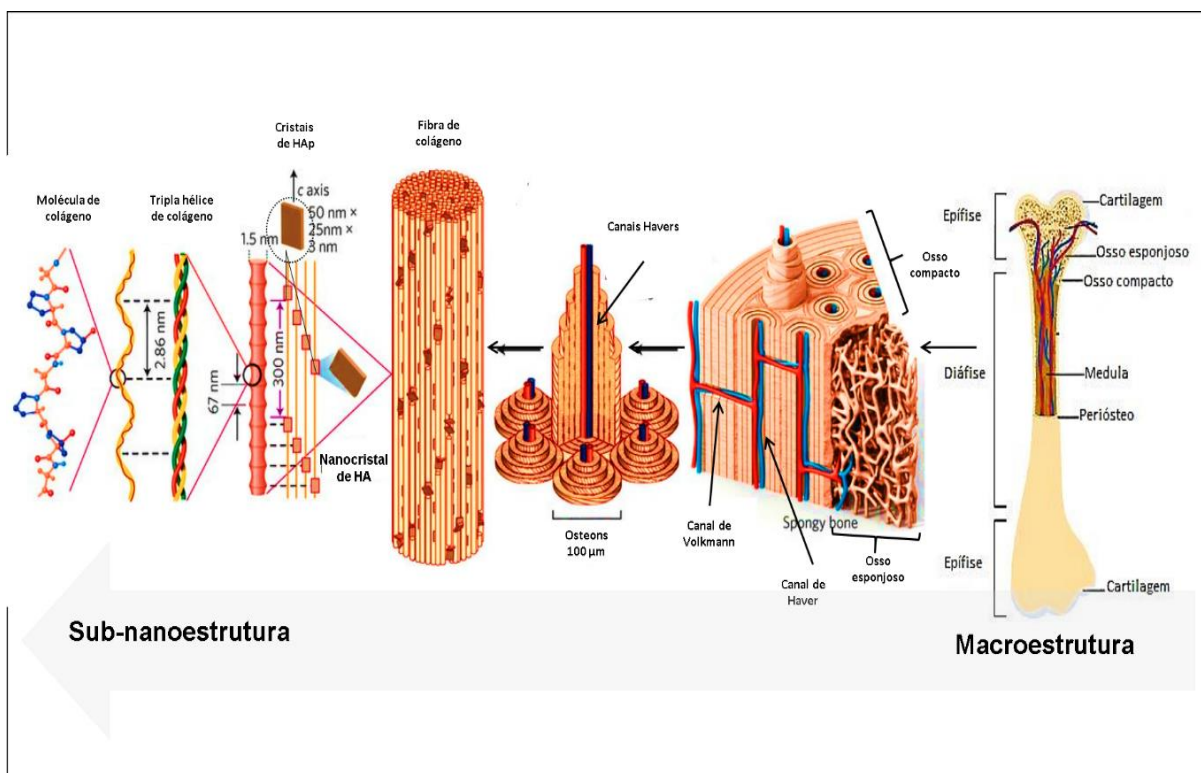
O termo “apatita” refere a uma grande família de minerais, organizada em nanocristais de minerais representados por uma fórmula genérica $(\text{M}_{10}(\text{ZO}_4)_6\text{X}_2)$ similar à fórmula química da hidroxiapatita $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$. Essa estrutura base apresenta as letras M, Z e X que representa os elementos da estrutura cristalina da hidroxiapatita, respectivamente, cálcio, fósforo e grupos hidroxila, que torna possível a formação de apatitas por diversos minerais naturais sob diversas condições e a aplicação desses compostos inorgânicos para a formação de biomateriais, que têm como base a união de uma matriz de colágeno a nanoapatitas (POGREBNJAK et al., 2019; LOPES et al., 2015).

O tecido ósseo saudável é uma estrutura complexa e capaz de resistir a cargas

fisiológicas, além da capacidade de se adaptar a novos ambientes por meio da remodelação. No entanto, o tecido ósseo é vulnerável ao envelhecimento esquelético, condições ambientais, e várias doenças ósseas genéticas ou metabólicas, que aumentam o risco de traumas ou afetam a integridade mecânica. Essas doenças incluem osteoporose, deficiência de vitamina D, e outras que afetam diretamente na qualidade estrutural do osso (NARAYANAN et al., 2016; ZIMMERMANN; BUSSE; RITCHIE, 2015).

O osso é a unidade básica do sistema esquelético humano, que serve de estrutura e suporte, além de proteger os órgãos vitais e hospedar células hematopoiéticas. Assim, o osso humano apresenta uma organização estrutural através de diferentes escalas de tamanho, desde as dimensões macroestrutura até sub-nanoestrutura, conforme apresenta a **Figura 4**.

Figura 4 - Estrutura hierárquica da matriz óssea humana em várias escalas de comprimento.



Fonte: adaptado de Eliaz e Metoki (2017).

A macroestrutura engloba o osso cortical e esponjoso, que é visível a olho nú. A microestrutura e sub-microestrutura integram os canais Havers, Volkman, Osteons e lamelas, a nanoestrutura inclui as fibras de colágeno como a fase mineral, e a sub-nanoestrutura compõe a estrutura molecular das proteínas orgânicas, colágeno e minerais (ELIAZ; METOKI, 2017).

Nesse contexto, a utilização de biomateriais com base em hidroxiapatita é bem comum em implantes biomédicos e bastante investigada no campo clínico, em que os biomateriais podem estar na forma de arcabouços, géis, pós, pastas e membranas. Assim, a sua utilização deve-se pela biosemelhança aos componentes de hidroxiapatita do tecido ósseo humano, que mostram ser biocompatível, biodegradável, osteocondutora, osteoindutora, bioativos e com poucas reações imunológicas ou inflamatórias, além de promover a proliferação de células do tipo osteoblastos quando aplicado em tecido ósseo (SOUSA et al., 2016; LOPES et al., 2015).

Os resíduos de peixes como as escamas se apresentam como fonte de colágeno e hidroxiapatita, por possuir uma alta concentração de cálcio, fósforo e outros minerais essenciais para remodelação óssea (MEAZZA, 2019; WANG et al., 2019; MELLO, 2017). Os estudos de Jeong et al. (2019), os íons cálcio e fosfato estimulam a formação de minerais ósseos que influenciam na formação e crescimento dos tecidos, principalmente, na regeneração óssea. Além disso, trabalhos científicos que estudaram os resíduos de peixes mostraram possuir propriedades físico-químicas semelhantes e adequadas à matriz ósseo-humana, exibindo biocompatibilidade com a fase inorgânica dos tecidos calcificados, ausência de toxicidade e reações imunogênicas, além de conferir uma boa adesão, proliferação e diferenciação celular. Assim, permite ser um bom candidato como um biomaterial a ser investigado como xenoenxerto (PAL et al., 2017; PON-ON et al., 2016; EL-RASHIDY et al., 2015).

2.3 Biodegradação e biocompatibilidade

A grande variedade de biomateriais permite, cada vez mais, a aplicação em diversas situações na engenharia de tecidos e na medicina. A biocompatibilidade e a biodegradação são duas características mais procuradas nos arcabouços ou dispositivos implantados, em que são comprovados em estudos *in vivo*, por meio da interação hospedeiro-material (YAZDIMAMAGHANI et al., 2017; ASGHARI et al., 2017).

A biocompatibilidade dos biomateriais, por definição, consiste na capacidade das células aderirem e migrarem para a superfície do biomaterial sem desencadear respostas tóxicas, imunogênicas, trombogênicas, carcinogênicas e irritação local ou sistêmica. Contudo, é importante destacar que a chave para o entendimento da biocompatibilidade também consiste na determinação dos mecanismos físico-químicos, bioquímicos, fisiológicos, dentre outros que atuam na interação entre os tecidos do corpo e os arcabouços ou dispositivos implantados. Assim, a biocompatibilidade é influenciada pelas características do material,

pelas respostas da interação organismo-material, como pelo local implantado (MOERBECK-FILHO et al., 2019; WILLIAMS, 2008).

A biodegradação é descrita como aqueles materiais biodegradáveis, isto é, podem degradar progressivamente no corpo de um organismo vivo até a completa dissolução pelos tecidos circulantes, enquanto completam a regeneração dos tecidos sem liberar resíduos tóxicos no local ou no sistema (ZHU et al., 2019).

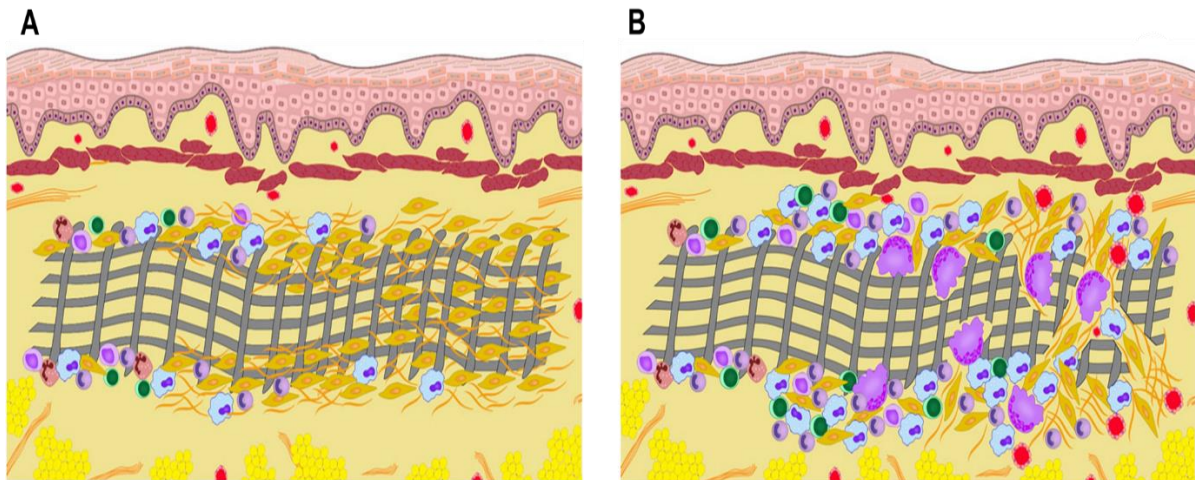
Nesse contexto, todas as características da biocompatibilidade e biodegradação do biomaterial influenciam no processo inflamatório, que são detectados a partir de uma análise histológica, por meio da observação das reações celulares, de neovascularização e encapsulamento, e assim determinar o padrão inflamatório induzido. Além disso, os arcabouços devem ser capazes de fornecer suporte mecânico apropriado e mostrar propriedades de superfície favoráveis a regeneração de tecidos moles e duros (ASGHARI et al., 2017; AL-MAAWI et al., 2017; TESHAMARIAM, 2016).

Após a implantação, ocorrem complexas respostas biológicas de imediato: reações celulares que incluem células mononucleares, polimorfonucleares e reação de corpo estranho baseada na presença adicional de células gigantes multinucleadas. E essas respostas requerem a participação do sistema imunológico inato e adaptativa (AL-MAAWI et al., 2017).

Diversos estudos apontam arcabouços baseados na combinação de colágeno-hidroxiapatita derivado de animais, possuindo as características de biocompatibilidade e biodegradação em resposta a células mononucleares, polimorfonucleares e células gigantes, porém esses arcabouços diferenciam apenas na composição bioquímica dos colágenos, que resultam na alta capacidade de diferenciação e proliferação tecidual ao longo dos tempos observados (SALGADO et al., 2016; ELANGO et al., 2016; RAHMANIAN-SCHWARZ et al., 2014).

A **Figura 5** mostra a resposta tecidual após o implante de biomateriais à base de colágeno derivado de suínos, que obtiveram reação fisiológica de células mononucleares, polimorfonucleares e células gigantes multinucleadas.

Figura 5: Ilustração das reações celulares aos biomateriais à base de colágeno de suínos em modelo de implantação subcutânea em um período de 60 dias. A- Reação caracterizada por células mononucleares e polimorfonucleares. B- Reação caracterizada por células gigantes multinucleadas.



Fonte: adaptado de Al-Maawi et al, (2017).

Os estudos com os biomateriais buscam suportes ideais e uma questão importante desses suportes é a fabricação normalizada na ISO 10993-6 (International Standards Organization) que determina diretrizes de cada biomaterial ou dispositivos médicos implantáveis, como a seleção de teses experimentais para verificação da biocompatibilidade e biodegradação de acordo com a espécie de animal estudada, além de avaliar as respostas inflamatórias e reparativas (ISO, 2007).

2.4 Dinâmica do processo inflamatório

Todos os tipos de biomateriais implantados *in vivo* usados por diferentes períodos de tempo induzem respostas celulares e teciduais (CHRISTO et al., 2015; SHEIKH et al., 2015).

A implantação de qualquer biomaterial consiste na lesão e na interação entre o hospedeiro-biomaterial, seguido de uma série de respostas celulares, coletivamente chamada de resposta a um corpo estranho, que visa a eliminar ou isolar o material estranho implantado no sistema do hospedeiro. Desse modo, a própria técnica de implantação acompanha injúria, por meio da ruptura de vasos ou capilares e tecidos, que desencadeia fenômenos de hemostasia, inflamação e reparativos proveniente da corrente sanguínea para o local do implante, que envolve uma cascata de reações de diferentes tipos de células (CARLO et al., 2007;

ANDERSON, 2001).

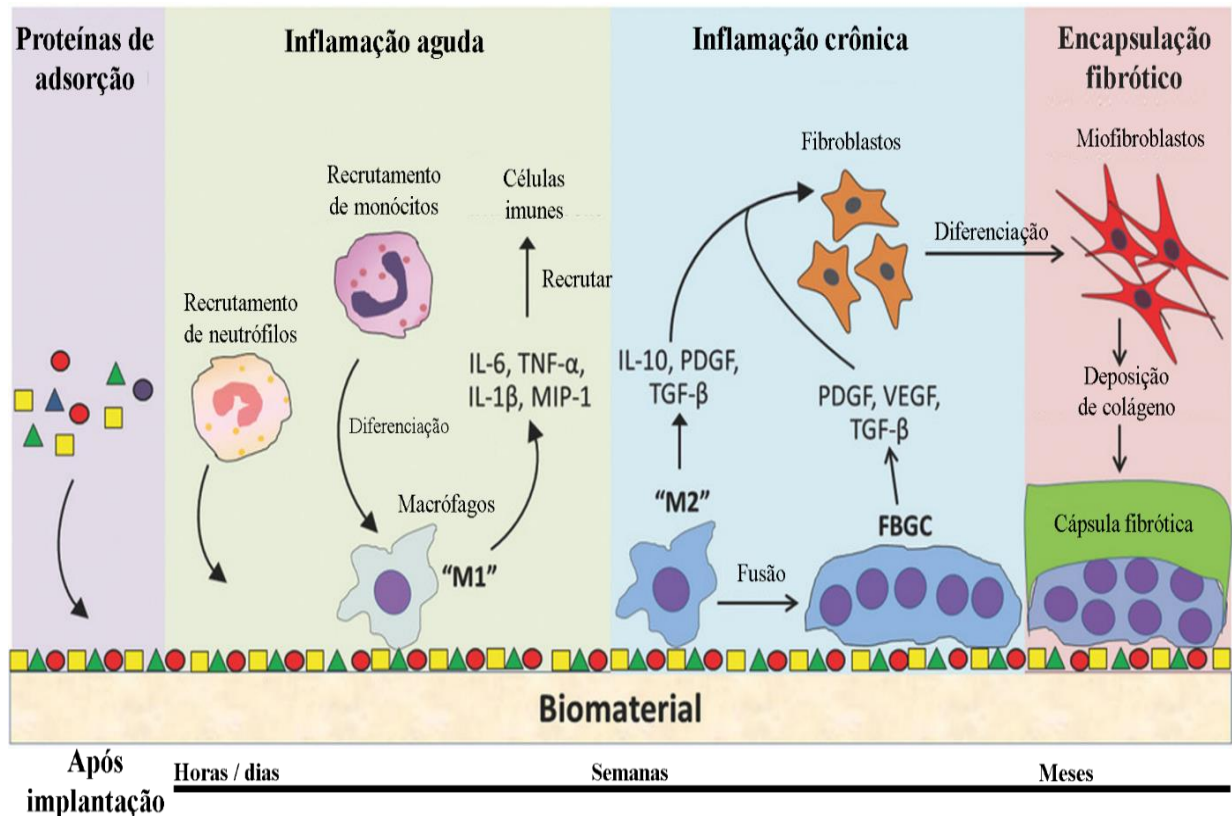
O mecanismo de hemostasia é a fase inicial, que ocorre dentro de segundos ou minutos após a injúria tecidual que acarreta mudanças no fluxo, calibre e permeabilidade dos vasos sanguíneos, onde um fluido de proteínas e células sanguíneas sai do sistema vascular para o tecido danificado por um processo chamado de exsudação, além de determinar o recrutamento de células inflamatórias. Por meio desse fenômeno, conseguem-se a ativação de uma cascata de eventos de coagulação, células do complemento e plaquetas, em que, os agregados de plaquetas sofrem degranulação e liberam citocinas e quimiocinas, atraindo, assim, neutrófilos e macrófagos, além de modular a atividade das células imunes em resposta à lesão. Ao mesmo tempo, as proteínas séricas adsorvem a superfície do biomaterial, desenvolvendo uma matriz provisória. E, a partir dessa matriz, liberam componentes quimiotáticos da inflamação para o processo de reorganização e reparo, por meio do recrutamento de células pró e anti-inflamatórias, e de fibroblastos para o local da lesão (ZHOU; GROTH 2018; VISHWAKARMA et al., 2016; KIM; CHEN; LIU, 2016; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

Após a hemostasia, ocorre o início imediato à resposta inflamatória aguda caracterizada pelo exsudato de proteínas e de plasma que levam à formação de edema e à emigração de leucócitos (ZHOU;GROTH, 2018).

Na inflamação aguda, há o recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Os macrófagos, ao aderirem aos biomateriais, são chamados de M1, que são grandes liberadores de citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-6, IL-1 β , IL-8) entre outras moléculas de sinalização, que controlam diversas respostas teciduais e imunológicas, além de remover células mortas e restos de tecido resultantes da incisão cirúrgica. Quando os M1 têm uma resposta frustrada, transformam-se em M2, que secretam citocinas, anti-inflamatórias (como a IL-10) e fatores de crescimento. Com a sua capacidade de degradação reduzida, atinge a atividade de remodelação tecidual, que induz a migração e a proliferação de fibroblastos para a regeneração tecidual ou cicatrização. Esses fatores devem-se quando os macrófagos adotam um espectro fenótipo de acordo com o microambiente. Assim, os macrófagos possuem dois subtipos diferentes quando ativados fenotipicamente: células pró-inflamatórias (M1) e células anti-inflamatórias ou reguladora (M2). Essa variação de ativação dos macrófagos é uma estratégia para modular as respostas do sistema imune nos locais do implantado (ZHOU; GROTH, 2018; AL-MAAWI et al, 2017; KIM; CHEN; LIU, 2016; CHRISTO et al., 2015).

A **Figura 6** ilustra a absorção ao biomaterial, como a inflamação aguda, crônica e encapsulação fibrótica.

Figura 6- Respostas da interação hospedeiro-biomaterial pós-implantação.



Fonte: adaptado de Zhou e Groth (2018).

A inflamação crônica segue a fase aguda frustrada, que é marcada pela presença de células mononucleares, incluindo macrófagos e linfócitos. Assim, com os eventos sobrepostos da troca fenotípica de M1 para M2 frustrados, resultam na fusão da membrana macrofágica para formar as células gigantes de corpo estranho na superfície do biomaterial, na tentativa de aumentar sua funcionalidade fagocitária, além da capacidade de os macrófagos adaptarem a funções de regulação imunitária (MARIANI et al., 2019; CHRISTO et al., 2015; KWEE; MOONEY, 2015).

A combinação de células inflamatórias com as células imunes resulta na liberação de fatores pró-fibrogênicos, fatores de angiogênese e fatores de crescimento por várias vias, que favorece a criação de tecido, regeneração de células epiteliais e formação de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes. Além disso, quando o biomaterial não é biodegradável, há o direcionamento para isolar, por meio da atração de fibroblastos ativos que depositam colágeno

na tentativa de reparar o tecido danificado na formação da cápsula fibrosa, porém a secreção excessiva produz um resultado final indesejável que está associada ao comprometimento da função do implante (MUKHERJEE et al., 2019; MARIANI et al., 2019; KWEE; MOONEY, 2015).

Os materiais biodegradáveis após um período de tempo são absorvidos e os seus produtos resultantes são atóxicos num organismo vivo. Estas características são considerados como indicadores de biodegradação, diferentemente dos não biodegradáveis que desencadeiam respostas ao corpo estranho ligado na formação da cápsula fibrosa, que circunda o implante e os seus produtos resultantes são atóxicos, são considerados como indicadores de biocompatibilidade (BADYLAK, 2015; MAIA et al., 2010; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Fontes naturais xenógenas de hidroxiapatita são buscadas para fins biotecnológicos, mais comumente de bovino, suíno ou avícola. Considerando que a fonte piscícola ainda é incipiente nessa obtenção e o cultivo de tilápia é a quarta maior do mundo, havendo grande potencial de exploração científica dessa procedência, segundo Castro-Silva et al. (2018). Conforme Gomes (2019), um biomaterial compósito, que conjugasse as propriedades orgânica do colágeno e mineral da apatita biológica, poderia ser mais vantajoso para o desenvolvimento de membranas para regeneração tecidual guiada ou regeneração óssea guiada.

A pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é biomimética à pele humana, devido à presença de colágeno tipo I, conforme Alves et al. (2015) e colágeno tipo III conforme Alves et al. (2018), o que sugere aplicabilidade na regeneração clínica de tecidos moles lesados. Lima-Junior et al. (2017) estudaram a pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como biocurativos de queimaduras em ratos que obtiveram boa aderência e um rápido processo cicatricial. Miranda e Brandt (2019) confirmaram a excelência desses biocurativos em humanos, mostrando ser um ótimo reepitelizante em menor período de tempo, que oferece uma melhor qualidade de vida aos pacientes e reduz os gastos públicos, diferentemente do tratamento convencional que acarreta sofrimento e elevados gastos. Recentemente tem-se investigado a neovaginoplastia com a construção de todas as camadas epiteliais, celulares e vasos sanguíneos própria da região genital em 180 dias (DIAS et al., 2019; BEZERRA et al., 2018).

Para garantir a eficácia de um novo biomaterial, devem ocorrer testes pré-clínicos de segurança biológica para descartar possível toxicidade (BITTENCOURT et al., 2014). Assim, a norma ISO 10993-6 trata dos testes biológicos *in vivo* para caracterização da biocompatibilidade de dispositivos médicos implantáveis que inclui os critérios inflamatórios e de reparo. Nesse sentido, espera-se que o xenoenxerto de subprodutos da *O. niloticus* contribua com o avanço dos biomateriais nacionais, possuindo eficácia ou ausência de toxicidade. Com base nos resultados esperados, a parceria UFC-EMBRAPA vislumbra geração de patentes, transferência da tecnologia para larga escala de produção e minimização do impacto ambiental da indústria piscícola no Ceará.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar as respostas biológicas dos três biocompósitos de gelatina e hidroxiapatita de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na forma de barreiras de membranas de regeneração óssea guiada implantadas em tecido subcutâneo de camundongos.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a biocompatibilidade (fenômenos inflamatórios e de reparo) dos biocompósitos de gelatina e hidroxiapatita segundo a norma ISO 10993-6 (2007).
- Avaliar a biodegradabilidade dos biocompósitos de gelatina e hidroxiapatita.

5 MANUSCRITO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE *IN VIVO* DA BIOCAMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE BIOCAMPÓSITOS DE GELATINA E HIDROXIAPATITA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

TITLE: *IN VIVO* STUDY OF BIOCAMPATIBILITY AND BIODEGRADATION OF BIOCAMPOSITES OF GELATIN AND HYDROXYAPATITE OF THE NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

AUTORES: Efigênia Maria de Sousa,^{a,b} Edla Ferreira Melo,^c Francisco Fábio Pereira de Souza,^d Hálisson Lucas Ribeiro,^e Judith Pessoa de Andrade Feitosa,^f Men de Sá Moreira de Sousa,^g Igor Iuco Castro-Silva.^{a,b,h*}

^aPrograma de Pós-graduação em Biotecnologia, *Campus* de Sobral, Universidade Federal do Ceará-UFC, Sobral, CE, Brasil.

^bLaboratório de Biomateriais, *Campus* de Sobral, Universidade Federal do Ceará- UFC, Sobral, CE, Brasil.

^cInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará -IFCE, Sobral, CE, Brasil.

^dPrograma de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará-UFC, *Campus* do Pici, Fortaleza, CE, Brasil

^ePrograma de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará-UFC, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, *Campus* do Pici, Fortaleza, CE, Brasil.

^fPrograma de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará-UFC, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, *Campus* do Pici, Fortaleza, CE, Brasil.

^gLaboratório de Tecnologia de Biomassa, Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal do Ceará - UFC, *Campus* do Pici, Fortaleza, CE, Brasil.

^hCurso de Odontologia, *Campus de Sobral*, Universidade Federal do Ceará-UFC, Sobral, CE, Brasil.

***Autor de correspondência: Igor Iuco Castro-Silva**

Endereço: Universidade Federal do Ceará, Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 100- Bloco de laboratórios da pós-graduação / Laboratório de Biomateriais. Jocely Dantes de Andrade Torres, Sobral, CE, Brasil, CEP: 62042-280. E-mail: igor.iuco@sobral.ufc.br.

RESUMO

A indústria da piscicultura brasileira gera subprodutos que permitem a extração de gelatina do colágeno e hidroxiapatita. O objetivo desta pesquisa foi analisar a biocompatibilidade e biodegradação de biocompósitos extraídos de *O. niloticus*. Os biocompósitos possuem diferentes concentrações de gelatina (G) e hidroxiapatita (HA):60%G:40%HA(G1), 70%G:30%HA(G2) e 80%G:20%HA(G3). A fase pré-clínica utilizou 30 camundongos, machos (30g), 15 submetidos à enxertia subcutânea com G1, G2 e G3 e 15 para enxertia da membrana colágeno comercial(C+) ou cirurgia sem enxerto(C-). Necrópsias dos tecidos subcutâneos em 1, 3 e 9 semanas foram processadas e incluídas em parafina. Cortes histológicos permitiram análise semiquantitativa por pontuações de critérios inflamatórios (neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas) e de reparo (neovascularização e tecido conjuntivo) conforme a norma ISO 10993-6, bem como a integridade de biocompósitos. A análise estatística dos dados não paramétricos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com $p < 0,05$. Como resultados, G1 foi pouco irritante até 9 semanas, enquanto G2 e G3 foram pouco irritantes até 3 semanas e não irritantes em 9 semanas, similares ao C+. Em 1 e 9 semanas, todos os grupos apresentaram uma redução do processo inflamatório, porém com persistência de células gigantes maior em G3. A neovascularização e tecido conjuntivo foram crescentes em 1, 3 e 9 semanas e a integridade dos biomateriais diminuiu até 9 semanas. Todos os materiais de *O. niloticus* foram biocompatíveis e parcialmente biodegradáveis, que apresentam um potencial para ser aplicado como membranas de regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: Colágeno. Materiais. Biocompatíveis. Tela subcutânea.

ABSTRACT

The Brazilian fish farming industry generates by-products that allow the extraction of collagen gelatin and hydroxyapatite. The objective of this research was to analyze the biocompatibility and biodegradation of biocomposites extracted from *O. niloticus*. Biocomposites have different concentrations of gelatin (G) and hydroxyapatite (HA):60%G:40%HA(G1), 70%G:30%HA(G2) e 80%G:20%HA(G3). The pre-clinical phase used 30 mice, males (30g), 15 undergoing subcutaneous grafting with G1, G2 e G3 and 15 for commercial collagen membrane grafting (C+) or non-graft surgery (C-). Necropsies of subcutaneous tissues in 1, 3 e 9 weeks were processed and embedded in paraffin. Histological sections allowed semiquantitative analysis by scores of inflammatory criteria (neutrophils, lymphocytes, macrophages, multinucleated giant cells) and repair (neovascularization and connective tissue) according to the norm ISO 10993-6, as well as the integrity of biocomposites. Statistical analysis of nonparametric data was performed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, with $p < 0.05$. As results, G1 it was little irritating up to 9 weeks, while G2 and G3 were mildly irritating for up to 3 weeks and non-irritating for 9 weeks, similar to C+. In 1 and 9 weeks, all groups showed a reduction in the inflammatory process, but with persistence of giant cells greater in G3. Neovascularization and connective tissue increased in 1, 3 and 9 weeks and integrity of biomaterials decreased until 9 weeks. All *O. niloticus* materials were biocompatible and partially biodegradable, which have the potential to be applied as guided bone regeneration membranes.

Key words: Collagen. Durapatite. Biocompatible materials. Subcutaneous Tissue.

INTRODUÇÃO

Williams [1] definiu biomaterial como uma ou mais substâncias em combinação, de origem natural ou sintética, usado durante qualquer tempo, para substituir parcial ou integralmente tecidos, órgãos ou funções corporais. Há uma gama de biomateriais, com grande variação quanto à sua composição, dimensão, estrutura, origem e aplicações [2]. O uso de biomateriais em humanos remonta há séculos, mas com os adventos biotecnológicos, a partir da segunda metade do século XX, houve aceleração de inovações e do desenvolvimento de novos produtos, biocompatíveis e biodegradáveis para uso clínico, oferecendo maior qualidade de vida [3].

Membranas e enxertos para a regeneração óssea guiada são alternativas promissoras capazes de auxiliar na recuperação morfofuncional do tecido lesado, em Ortopedia e Cirurgia Oral [4]. A procedência natural humana, incluindo autógena ou alógena, tem dado lugar à xenógena, em razão da maior disponibilidade e comercialidade, bem como a aloplástica, por dispensar um doador [4, 5]. Dentre os biomateriais mais estudados na literatura, os compósitos podem ser do tipo polímero-cerâmica ou metal-cerâmica. Combinações orgânicas e inorgânicas são investigadas para a regeneração do tecido ósseo, incluindo o favorável biomimetismo e sinergismo de apatita e colágeno naturais de várias espécies animais, como bovinos, suínos e avícolas [6, 7].

O crescimento da indústria piscícola e da produção mundial de *Oreochromis niloticus* geram subprodutos como pele e escamas [8, 9]. O possível aproveitamento desses subprodutos como matéria-prima para extração de biomateriais compósitos seria útil na perspectiva da sustentabilidade global [8]. Dentre os subprodutos, a pele e as escamas dos peixes apresentam componentes biomiméticos ao do corpo humano [8]. A partir da pele de *O. niloticus* é feita a extração da gelatina, que possui colágeno tipo I [10, 11]. As escamas são fonte de colágeno, hidroxiapatita e possuem uma alta concentração de cálcio e fosfato [8]. Essa combinação, na forma de arcabouços teciduais pode ser bom eleito na formação de um biomaterial aplicável à regeneração óssea [8, 9, 10, 11].

A biocompatibilidade de materiais pode ser influenciada por suas características intrínsecas, pela interação com o organismo e pelo local de implante, sendo esperado que não haja a liberação de substâncias tóxicas locais ou sistêmicas que elicitam um processo inflamatório exuberante, mas sim, haja o favorecimento do reparo *in situ* [12, 13, 14]. Após o implante de um material biocompatível, há previsão de resposta imune inata e adaptativa, com progressão de decréscimo da densidade de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e, mais tardiamente, de células gigantes multinucleares, intimamente associadas à sua biodegradação

[13].

Os materiais biodegradáveis, quando implantados em um organismo vivo, perdem sua integridade progressivamente até a completa reabsorção pelos tecidos circulantes [12]. Biomateriais usados em regeneração óssea devem ser capazes de fornecer suporte mecânico apropriado e mostrar propriedades de superfície favoráveis para a regeneração de tecidos moles e duros, sendo um desafio para pesquisadores modularem a aceleração da biodegradação [12, 13, 14].

O uso de sistemas biológicos internacionalmente normalizados pela ISO 10993-6 é fundamental para garantir a confiança e reprodutibilidade dos testes de novos biomateriais [15]. O tecido subcutâneo de camundongos constitui um modelo experimental adequado, tanto pelos aspectos logísticos de acesso cirúrgico e manutenção dos espécimes quanto pela genética, incluindo sua biologia bem conhecida e a similaridade com o genoma humano [16].

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a análise da biocompatibilidade e biodegradabilidade de três biocompósitos de gelatina e hidroxiapatita de *O. niloticus in vivo* na forma de barreiras de membrana para regeneração óssea guiada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos ético-legais

O acesso à matéria-prima natural proveniente de amostras de tilápia, espécie aquática introduzida no território nacional, não se aplicou à lei da biodiversidade brasileira e está em conformidade com as regulamentações nacionais gerenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (ANEXO B). Este estudo foi realizado de acordo com o procedimento descrito na ISO 10993-6 [15] e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ceará, sob registro de nº 01/19 (ANEXO C).

Material teste

Os biocompósitos foram obtidos de peles e escamas de *Oreochromis niloticus*, provenientes de um frigorífico de filetagem de pescado. O processamento das amostras incluiu a geração de três distintas formulações ou grupos: G1 (60% de gelatina:40% de hidroxiapatita), G2 (70% de gelatina:30% de hidroxiapatita) e G3 (80% de gelatina:20% de hidroxiapatita). As amostras sofreram reticulação com 1% de riboflavina, liofilização e

padronização em formato quadrangular (10 mm²), com espessura de 2mm.

A caracterização físico-química prévia dos três biocompósitos incluiu as análises Termogravimétrica e sua derivada (TGA/DTG), de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e de Difração de Raio-X (DRX), confirmando pelos testes, em síntese, que os materiais: apresentaram boa estabilidade térmica em temperaturas menores que 175°C (considerando perda de água e degradação proteica); morfologia rugosa e ondulada, com poucas estruturas lamelares; bandas ou grupos orgânicos compatíveis com amidas A e B (gelatina), amida I, II e III (ligações peptídicas, com deformação); e picos de estrutura mineral/triplete compatível com hidroxiapatita, mais perceptíveis de acordo com as concentrações formuladas [17].

Toda a fase de fabricação e caracterização físico-química dos materiais-testes foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPAT/EMBRAPA, UFC, Campus do Pici, Fortaleza, CE, Brasil).

Sob o aspecto da biossegurança, todos os materiais-teste e controle passaram por procedimento de esterilização a frio, dispostos em placas de 24 poços dentro de cabine de segurança biológica (Pachane, EUA) com luz ultravioleta, por um período de 30 minutos, permanecendo selados com Parafilm M[®] (Bemis NA, EUA) até o momento de sua aplicação nas cirurgias. Todo o instrumental cirúrgico utilizado nas cirurgias passou por esterilização por calor úmido e pressão (autoclave a 121°C, 1 ATM, ciclo de 15 minutos).

Animais

Para a caracterização *in vivo*, os animais foram alojados em um ambiente laboratorial com temperatura e ventilação controlada, ciclos de claro/escuro de 12h cada, supridos de água e ração peletada *ad libitum*, e monitorados diariamente pela pesquisadora responsável.

Foram adotados os princípios dos 3R – (Redução, Refinamento e Substituição) para minimizar o uso de espécimes, salvaguardando o bem-estar animal [18]. Trinta camundongos saudáveis, *Mus musculus*, raça Swiss, albinos, machos adultos, com peso de 30g, foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais por condição experimental (1, 3 e 9 semanas). Quinze animais foram utilizados para os grupos testes G1, G2 e G3 e quinze animais foram utilizados para os grupos controle positivo (C+: membrana de colágeno bovino LuminaCoat Double Time, Criteria Ltda[®], SP, Brasil) e negativo (C-: bolsa subdérmica sem enxertia, preenchida com o próprio coágulo sanguíneo da cirurgia).

Cirurgia ectópica em tecido subcutâneo

Os animais foram anestesiados com uma solução injetável de quetamina a 10% (Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) na dose de 100mg/kg e xilazina a 2% (Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) na dose de 12 mg/kg, via intramuscular no músculo quadríceps de cada espécime. Cada animal foi colocado sobre um campo estéril para a tricotomização da região tronco-dorsal com uma lâmina de bisturi nº 20 e recebeu antissepsia da área a sofrer cirurgia com solução de clorexidina aquosa a 0,5%. Foram realizadas incisões lineares de 1 cm com cabo de bisturi Bard nº 3 e lâmina de bisturi nº 15, seguidas das respectivas divulsões de tecido com tesoura de ponta romba para a formação de bolsas subdérmicas. Uma vez acessados os leitos subcutâneos, em área criada compatível a 10 mm², foram realizados os enxertos dos materiais-teste ou C+, sendo deixado o C- sem enxertia (APÊNDICE A). Após as cirurgias, a etapa final de síntese dos tecidos foi realizada por suturas simples com fio de nylon 4-0, com o auxílio de uma pinça anatômica dente de rato e porta agulha de Mayo (APÊNDICE B).

A **Figura 1** demonstra o aspecto dos hidrogéis liofilizados dos três grupos experimentais (A) e do implante de amostra no leito subcutâneo de camundongo (B).

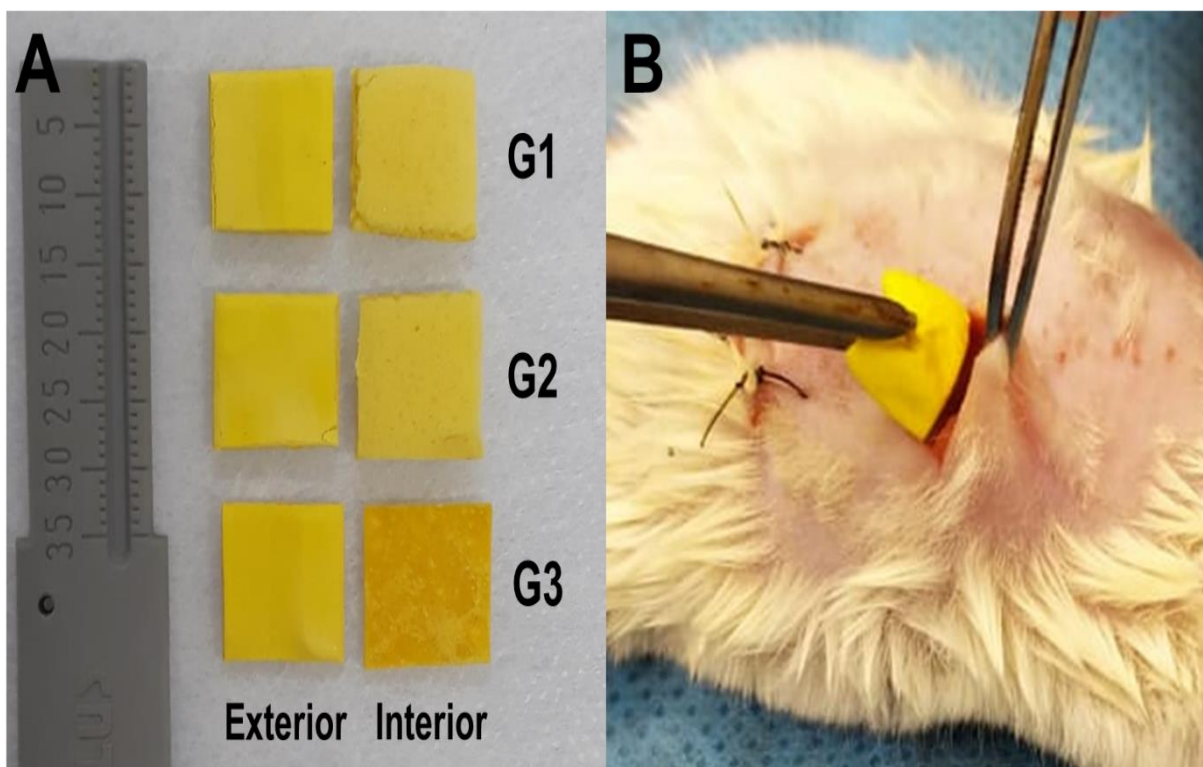


Fig. 1. (A) Os três biocompósitos: G1, G2 e G3. (B) Implante subcutâneo de amostra em subcutâneo de camundongos.

Após as cirurgias, todos os animais foram supervisionados até o momento da eutanásia.

Eutanásia e processamento histológico

Os animais foram sacrificados por uma sobredose da solução anestésica, via intraperitoneal, tiveram a região tronco-dorsal tricotomizada e foi realizada a imediata necrópsia excisional da área compatível com cada cirurgia. As necrópsias foram fixadas em solução de formol tamponado 4%, pH 7,0, por 48 h (APÊNDICE C). As carcaças foram descartadas em saco plástico de risco biológico e armazenadas em um freezer vertical para posterior serem coletadas pelos responsáveis da instituição de ensino para incineração. Após a fixação, as necrópsias foram clivadas, descalcificadas com uma solução ácida descalcificante rápida (Allkimia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 12 h, lavadas em água corrente por 1h, desidratadas em banhos crescentes de etanol, banhadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina. As amostras emblocadas em parafina foram microtomizadas em cortes com 4 μ m de espessura e coradas em Hematoxilina-Eosina (HE).

Análise histopatológica

Para a biocompatibilidade e biodegradação, foi realizada uma análise descritiva e semiquantitativa. As lâminas histológicas foram examinadas com a supervisão de um patologista experiente. Cinco imagens de cada amostra foram capturadas em campos adjacentes e não sobrepostos em câmera fotográfica do iPhone 6S, zoom digital de 4x, acoplada através de um CitoHelper (Hoyvin-mayvin Instrumento Óptico Co., Ltd, China) a microscópio de luz (Leica Microsystems Wetzla GMBH, Alemanha), objetiva de 40x, perfazendo uma magnificação final de 1600x.

Para análise descritiva, as melhores lâminas de cada grupo experimental foram selecionadas e descritas morfológicamente, para representação dos eventos observados.

A análise semiquantitativa de biocompatibilidade adotou os critérios recomendados pela norma da ISO 10993-6 (2007) (Anexo E). A norma avalia os critérios inflamatórios e reparativos, em pontuações de 0 a 4, gerando a partir desses critérios um sistema numérico capaz de determinar o padrão de irritação. Para isso, o padrão de irritação utilizou três equações: (1) equação do padrão de inflamatório (I_x); (2) equação do padrão de reparo (R_x); (3) equação do score total de irritação.

$$I_x = 2 \left(\frac{\sum(N + L + M + C)}{n} \right) \quad (1)$$

Onde, I_x = padrão de inflamação; o subíndice x corresponde aos grupos teste (t) ou controle (c); N = mediana do score dos neutrófilos por animal; L = mediana do score dos linfócitos por animal; M = mediana do score dos macrófagos por animal; C = mediana do score de células gigantes por animal, e n quantidade de animais por grupo.

$$R_x = \frac{\sum(A + F)}{n} \quad (2)$$

O R_x representa o padrão de reparo; o subíndice x corresponde aos grupos teste (t) ou controle (c); A = mediana do score de neovascularização por animal; F = mediana do score de fibrose por animal, e n quantidade de animal por grupo.

$$S = (I_t + R_t) - (I_c + R_c) \quad (3)$$

O S = Score total de irritação; I_t = padrão de inflamação dos grupos teste; R_t = padrão de reparo do grupo teste; I_c = padrão de inflamação do grupo controle; R_c = padrão de reparo do grupo controle.

Após os cálculos gerais, a norma ISO 10993-6 adota o controle negativo como padrão para os demais grupos, por meio da subtração. Logo, seu padrão de irritação é pontuado como zero e as condições experimentais seguem os seguintes padrões: não irritante (0,029); pouco irritante (3,0-8,9); moderadamente irritante (9,0-15,0); ou severamente irritante (>15).

A análise semiquantitativa de biodegradabilidade explorou a integridade dos materiais enxertados, em pontuação de 0 a 4.

Análise estatística

Todos os dados brutos foram tabulados em planilha Excel (Microsoft Office, EUA) e, posteriormente, analisados estatisticamente pelo GraphPad InStat 3.10 (GraphPad Software, EUA), para as comparações intragrupos e intergrupos. Para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, com grau de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análise descritiva

A **figura 2** mostra os efeitos biológicos da biocompatibilidade e biodegradação após o

implante dos grupos G1, G2, G3, C+ e C-, em 1, 3 e 9 semanas, de acordo com os critérios estabelecidos pela ISO 10993-6: 2007 / Parte 6 / Anexo E.

Em uma semana (**figura 2**), foi observado um intenso infiltrado inflamatório nos grupos experimentais e leve nos grupos controles. Nesse período, os grupos G1, G2, G3 apresentaram um intenso infiltrado inflamatório misto (células mononucleares e polimorfonucleares), com uma discreta neovascularização, com uma rara presença de células gigantes e presença de tecido conjuntivo frouxo. Para os aspectos de biodegradação, observou-se uma integridade moderada dos enxertos.

Após 3 semanas (**figura 2**), notou-se um leve infiltrado inflamatório misto e uma presença moderada de células gigantes para os grupos G1, G2, G3 e C+. Para o grupo C- verificou-se um leve infiltrado inflamatório de células do tipo mononucleares e ausência de células gigantes. Em relação às respostas de reparo, foi verificada uma discreta presença de neovascularização e de tecido conjuntivo denso. Nesse período, os biocompósitos testes implantados (G1, G2 e G3) sofreram uma leve redução do seu tamanho inicial.

Em 9 semanas (**figura 2**), observou-se uma ausência de células inflamatórias do tipo mononucleares e polimorfonucleares para todos os grupos, porém com persistência de células gigantes nos grupos experimentais testes. Nesse período, para às respostas de reparo, verificou-se uma discreta presença de neovascularização e um aumento de tecido conjuntivo denso para os materiais-testes e controles. Em relação à biodegradação, verificou-se o contínuo processo de redução do seu tamanho inicial, considerado parcialmente degradado.

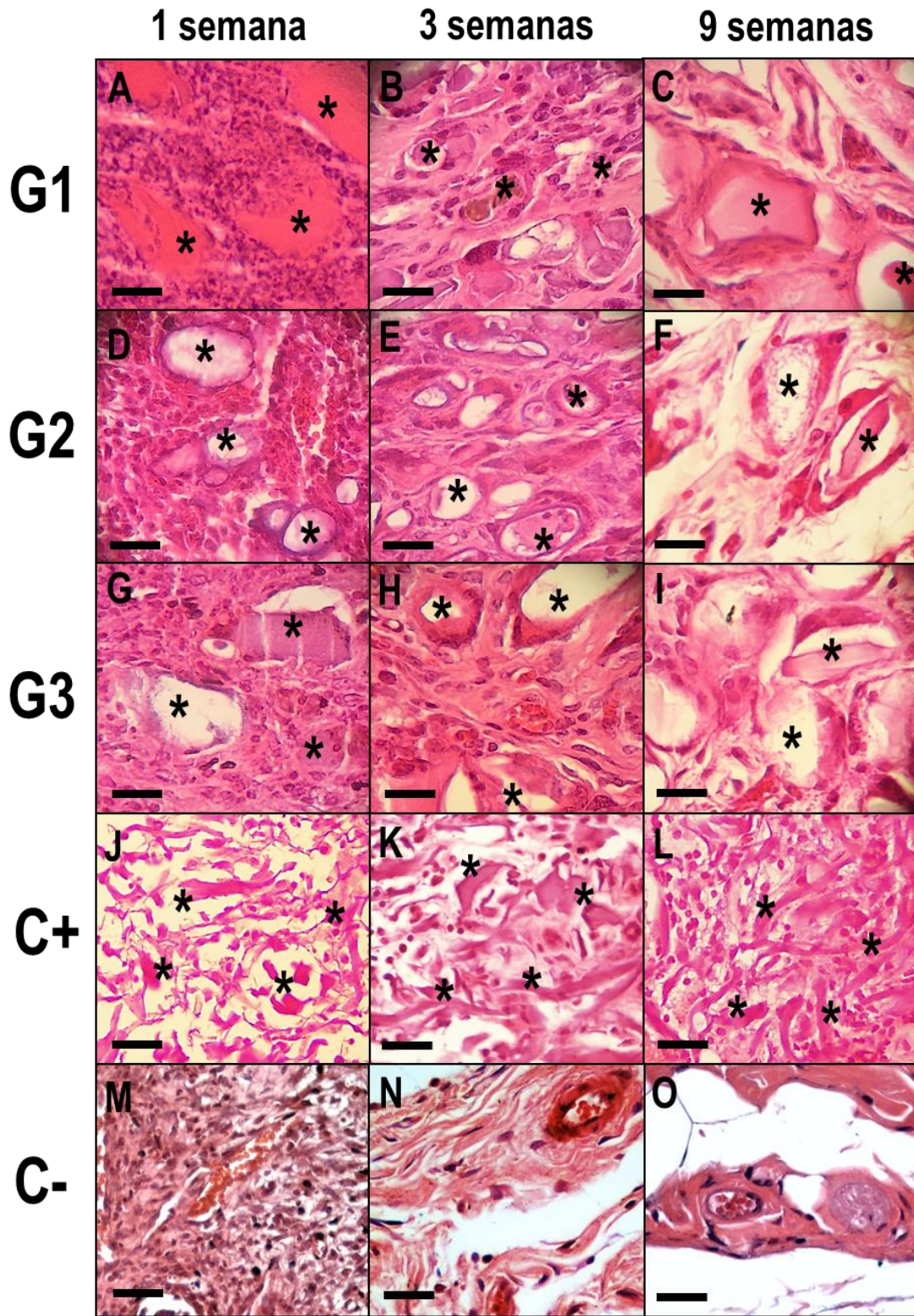


Fig. 2. Fotomicrografia de G1, G2, G3, C+ e C- implantado em tecido subcutâneo de camundongos em 1, 3, 9 semanas. *Material implantado. Barra de escala: 20µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 1600x. Barra de escala: 20µm.

Análise de biocompatibilidade pela norma ISO 10993-6

A análise semiquantitativa dos critérios inflamatórios avaliou as pontuações dos neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho, enquanto a análise dos critérios reparativos avaliou angiogênese ou neovascularização e tecido conjuntivo ou fibrose (APÊNDICES D, E e F) baseado na ISO 10993-6 para os grupos G1, G2, G3 e C+, onde o C- serviu de parâmetro para os demais grupos, em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto.

A biocompatibilidade em 1 semana foi classificada como pouco irritante para os grupos G1, G2 e G3, diferentemente do C+, não irritante. Em 3 semanas, todos os grupos testes incluindo o C+ foram classificados como pouco irritantes. Em 9 semanas, os grupos G2 e G3 foram semelhantes ao C+, não irritante. Ainda em 9 semanas, o grupo G1 foi classificado como pouco irritante e C+, não irritante. Para análise intragrupo, o G1 foi pouco irritante em todos os tempos experimentais e G2 e G3 não irritante, em 9 semanas (**Tabela 1**).

Tabela 1: Análise semiquantitativa do padrão de irritação de G1, G2, G3 e C+ em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais segundos a ISO 10993-6 (2007).

	Pontuações por tempo experimental			
	G1	G2	G3	C+
1 SEMANA	8,8 Pouco irritante	6,4 Pouco irritante	6,8 Pouco irritante	0 Não irritante
3 SEMANAS	7,6 Pouco irritante	5,2 Pouco irritante	4,4 Pouco irritante	5,2 Pouco irritante
9 SEMANAS	4 Pouco irritante	2,2 Não irritante	2,6 Não irritante	0 Não irritante

Legenda: 60%G:40%HA(G1);70%G:30%HA(G2);80%G:20%HA;C+(Membrana de colágeno bovino). O C- serviu de padrão para os demais grupos. Padrão de irritação ISO 10993-6: não irritante (0,029); pouco irritante (3,0-8,9); moderadamente irritante (9,0-15,0); severamente irritante (>15).

Análise estatística de biocompatibilidade e biodegradabilidade

A **tabela 2** mostra a mediana da contagem dos critérios inflamatórios (neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células gigantes do tipo copo estranho) para todos os grupos (G1, G2, G3, C+ e C-), em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, e análise intergrupos entre os grupos testes e controles.

Para o critério de neutrófilos, em 1 semana, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferenças significativas comparados aos C+ e C- ($p < 0,001$). Em 3 semanas, o G1 apresentou diferença significativa comparado ao grupo C- ($p < 0,05$). Em 9 semanas, detectou ausência de diferenças significativas.

Tabela 2: Análise semiquantitativa dos critérios inflamatórios de G1, G2, G3, C+ e C- em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	NEUTRÓFILOS				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	3(1-4) ^a	2(0-3) ^a	2(1-4) ^a	0(0-0) ^a	0(0-1) ^a
3 SEMANAS	1(0-2) ^c	0(0-2)	0(0-1)	0(0-3)	0(0-1) ^c
9 SEMANAS	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-0)
	LINFÓCITOS				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	2(0-3) ^{b,c}	1(0-3)	2(1-3) ^{a,b}	1(1-2) ^{a,b}	1(0-1) ^{bc}
3 SEMANAS	1(0-1) ^a	0(0-1) ^a	1(0-1) ^{a,c}	2(1-3) ^a	1(0-1) ^c
9 SEMANAS	0(0-1)	0(0-2)	0(0-1)	1(0-1)	0(0-1)
	MACRÓFAGOS				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	1(0-2) ^{a,c}	1(0-1) ^{a,c}	1(0-1) ^{a,c}	0(0-1) ^a	0(0-2) ^c
3 SEMANAS	0(0-1)	1(0-1)	0(0-1)	1(0-1)	0(0-1)
9 SEMANAS	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
	CÉLULAS GIGANTES DO TIPO CORPO ESTRANHO				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	0(0-3)	0(0-2)	0(0-2)	0(0-2)	0(0-1)
3 SEMANAS	2(0-3) ^{a,b}	2(1-3) ^a	2(1-3) ^{a,b}	1(0-2) ^{a,b}	0(0-1) ^a
9 SEMANAS	1(0-3) ^{a,b}	1(0-3) ^{b,c}	2(0-3) ^a	0(0-1) ^{a,b,c}	0(0-1) ^{a,b}

Legenda:60%G:40%HA(G1);70%G:30%HA(G2);80%G:20%HA;C+(Membrana de colágeno bovino); C- (coágulo sanguíneo). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P<0,001$ (a); $P<0,01$ (b), $P<0,05$ (c).

No critério de linfócitos, em 1 semana, o grupo G3 apresentou diferença significativa comparado ao C+ ($p<0,001$). Em 3 semanas, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferenças significativas comparado ao C+ ($p<0,001$). Em 9 semanas, não se detectou diferenças significativas quanto à presença de linfócitos.

Ao critério de macrófagos, em 1 semana, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferenças significativas comparados aos grupos C+ ($p<0,001$), diferentemente, quando comparado ao C- ($p<0,05$). Em 3 e 9 semanas, não foram detectadas diferenças significativas.

Já o critério de células gigantes do tipo corpo estranho, em 1 semana, não houve diferenças significativas. Mas, em 3 semanas, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferenças significativas comparado ao C+ ($p<0,001$). Em 9 semanas, a presença de célula gigantes

multinucleadas do tipo corpo estranho, G1 e G3 apresentaram diferenças significativas comparado ao C+ ($p < 0,001$).

A **tabela 3** mostra a mediana da contagem dos critérios reparativos (angiogênese ou neovascularização e tecido conjuntivo ou fibrose) para todos os grupos (G1, G2, G3, C+ e C-), em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, e análise intergrupos entre os grupos testes e controles.

Tabela 3: Análise semiquantitativa dos critérios reparativos (angiogênese ou neovascularização e tecido conjuntivo ou fibrose) de G1, G2, G3, C+ e C- em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	NEOVASCULARIZAÇÃO				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	1(0-3) ^b	1(0-2) ^b	2(0-3) ^a	0(0-1) ^{a,b}	1(0-3)
3 SEMANAS	1(0-2)	1(0-2)	1(1-2)	1(0-3)	1(0-2)
9 SEMANAS	1(0-2)	1(0-2)	1(0-2)	0(0-4)	1(0-2)
	TECIDO CONJUNTIVO				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	1(1-2)	1(1-2)	1(0-2) ^c	1(0-2)	2(1-2) ^c
3 SEMANAS	3(2-4) ^a	3(1-4) ^{a,c}	2(1-3)	1(0-2) ^a	1(1-2) ^{a,c}
9 SEMANAS	3(2-4) ^{a,c}	3(1-4) ^a	1(1-4)	1(0-3) ^a	1(1-2) ^c

Legenda: 60%G:40%HA(G1);70%G:30%HA(G2);80%G:20%HA;C+(Membrana de colágeno bovino); C- (coágulo sanguíneo). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,001$ (a); $P < 0,01$ (b), $P < 0,05$ (c).

Para o critério de neovascularização, em 1 semana, o grupo G3 apresentou uma maior diferença significativa comparado ao C+ ($p < 0,001$), diferentemente dos grupos G1 e G2, exibiram diferenças significativas comparado ao C+ ($p < 0,01$). Em 3 e 9 semanas, todos os grupos não apresentam diferenças significativas intergrupos.

Na análise do critério de tecido conjuntivo, em 1 semana, o grupo G3 apresentou diferença significativa comparado ao C- ($p < 0,05$). Em 3 semanas, a presença de tecido conjuntivo foi mais significativa nos grupos G1 e G2 comparado ao C+ e C- ($p < 0,001$), e o grupo G2 também apresentou diferença significativa comparado ao C- ($p < 0,05$). Em 9 semanas, os grupos G1 e G2 exibiram diferenças significativas comparado ao C+ ($p < 0,001$), e o grupo G1 apresentou diferença significativa comprado ao C- ($p < 0,05$).

A **tabela 4** mostra a mediana da contagem da presença de materiais enxertados para os grupos G1, G2, G3, C+ e C- como parâmetro, em 1, 3 e 9 semanas, em análise intergrupos entre os grupos testes e controles.

Tabela 4: Análise semiquantitativa da biodegradação de G1, G2, G3, C+ e C- em modelo subcutâneo, nos três tempos experimentais. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	PRESENÇA DE MATERIAL ENXERTADO				
	G1	G2	G3	C+	C-
1 SEMANA	2(1-2) ^a	1(1-3) ^c	1(1-4) ^{a,b}	4(3-4) ^b	0(0-0) ^{a,c}
3 SEMANAS	2(1-4) ^a	1(1-2) ^a	2(1-3) ^{a,c}	4(3-4) ^{a,c}	0(0-0) ^a
9 SEMANAS	1(1-2) ^a	1(1-2) ^b	1(0-2) ^c	4(0-4) ^{a,b}	0(0-0) ^c

Legenda: Legenda:60%G:40%HA(G1);70%G:30%HA(G2);80%G:20%HA;C+(Membrana de colágeno bovino); C- (coágulo sanguíneo). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P<0,001$ (a); $P<0,01$ (b), $P<0,05$ (c).

Na análise da presença de material enxertado, entre todos os grupos testes e controle positivo, em 1 semana, observou que os biocompósitos foram cobertos de células inflamatórias, sendo que o G3 apresentou diferença significativa comparado ao C+ ($p<0,01$). Em 3 semanas, G1, G2 e G3 apresentaram diferenças significativas comparado ao controle C+ ($p<0,001$). Em 9 semanas, G1 mostrou diferença significativa comparado ao C+ ($p<0,001$). Diferentemente, o G2 apresentou diferença significativa comparado ao C+ ($p<0,01$) e o G3 apresentou menor diferença significativa comparado ao C- ($p<0,05$). Assim, constatou-se que os grupos G1, G2, G3 e C+ mantiveram a presença parcial dos biomateriais após 9 semanas, porém em scores reduzidos ou mínimo.

Assim, os materiais testes mostraram-se biocompatíveis, com uma boa taxa de biodegradação, permitindo a invasão de células. Em relação à resposta inflamatória, houve diferença entre os grupos experimentais e controles, mostrando que a resposta inflamatória foi intensa em uma semana, visto que houve um procedimento cirúrgico realizado.

DISCUSSÃO

Os achados gerais de biocompatibilidade segundo a norma ISO 10993-6 desse estudo com materiais de origem piscícola se aproximam de Gomes [19], com materiais oriundos de subprodutos avícolas apresentando um padrão uniforme de não irritação em 9 semanas. A pouca irritação encontrada em G1 em 9 semanas, tal como no material de 90% de

colágeno:10% de nanoqueratina testado por Gomes [19] em 3 semanas, poderia ser explicada de acordo com a concentração aumentada de hidroxiapatita ou nanoqueratina nesses grupos, respectivamente, mostrando que a composição pode influir diretamente nos resultados.

Infiltrado inflamatório intenso e misto em 1 semana para todos os materiais, com exuberante presença de células polimorfonucleares e linfócitos, também foi relatado por Jardelino et al. [20], ao testar a biocompatibilidade de uma membrana aloplástica de alginato-capsul. Muñoz, Cardona-Ramirez e Silva [21] relataram um aumento inicial de polimorfonucleares para um xenoinxerto bovino de hidroxiapatita-zinco. Baseado nesses achados, confirma-se a presença esperada dessas células, integrantes dos primeiros dias pós-cirurgia de enxerto, que tendem a decrescerem gradualmente em 3 semanas até praticamente desaparecerem em 9 semanas [22].

A presença de células gigantes multinucleadas foi em geral moderada e mais tardia, expressa em 3 semanas nos compósitos testados. A expressão desse perfil celular varia, com achados em 2 semanas por Salgado et al. [23] ao testar biocompósito de nano-hidroxiapatita e colágeno, ou em 30 dias por Pereira et al. [16], avaliando um enxerto aloplástico de hidroxiapatita. Segundo Herrera-Vizcaíno et al. [24], as células gigantes são formadas pela fusão de macrófagos, estimuladas por biomateriais colagenosos com ligações cruzadas e fluidos corporais locais. Por outro lado, Al-Maawi et al. [25] relatam que as células gigantes são mais comuns em materiais sintéticos, com propriedades físico-químicas de polímeros induzindo reações celulares relacionadas à reabsorção de biomateriais.

A discreta neovascularização e o crescimento gradual de tecido conjuntivo foram similares aos achados de Sena et al. [26] para um compósito aloplástico, nos três tempos experimentais. Salgado et al. [23] obtiveram um aumento gradual da neovascularização e tecido conjuntivo nos tempos de 1, 2 e 4 semanas, ambos favorecidos pela infiltração de células endoteliais e fibroblastos pela estrutura porosa do arcabouço usado. Células gigantes circundantes do biomaterial expressam fator de crescimento endotelial vascular, o que também estimula indiretamente a neovascularização [24, 25].

As primeiras membranas usadas em Regeneração Óssea Guiada (ROG) foram sintéticas não reabsorvíveis, incluindo malhas metálicas, de titânio aplicada em grandes defeitos ósseos, ou poliméricas, de politetrafluoretileno para defeitos pequenos a moderados. A nova geração de membranas reabsorvíveis conta hoje com biopolímeros, compostos por colágeno em maioria e com degradação enzimática, com apenas alguns compósitos adicionando a hidroxiapatita, reabsorvida por células gigantes multinucleadas [27,28].

A gelatina possui capacidade se integrar bem a qualquer ambiente interno, seja de

animais ou humanos, reduzindo a inflamação crônica [29]. Jung et al. [28] observaram na ROG de calvária de coelhos usando gelatina de pele de atum a conservação das propriedades mecânicas do material e inibição de invasão de tecidos moles na área, até 4 semanas do experimento. Sbricoli et al. [30] ainda reforçam o biomimetismo de membrana de colágeno com a molécula do tipo I nativa no próprio tecido conjuntivo periodontal. Sancilio et al. [31] afirmaram que a gelatina do colágeno em associação com hidroxiapatita auxilia na formação de cálcio e fosfato, componentes importantes para mineralização óssea. Salgado et al. [23] apontaram que os cristais de hidroxiapatita em tecido subcutâneo não são degradados rapidamente e induzem uma pequena inflamação crônica, mas seriam ideais para o preenchimento ósseo, pois conservam por mais tempo sua estabilidade, tendo degradação mais lenta.

Jardelino et al. [32] relataram que a biodegradação é uma característica desejável nos biomateriais para aplicação odontológica, evitando um segundo procedimento cirúrgico, sendo recomendável uma integridade estrutural e funcional mínima de seis semanas para garantir a regeneração do osso perdido. Modular negativamente a velocidade da biodegradabilidade de um biomaterial com alto teor orgânico permanece como o maior desafio, baseado nos variáveis tempos encontrados na literatura [20,32].

Wang et al. [33] observaram degradação total em 28 dias para um hidrogel de queratina de frango, enquanto Jardelino et al. [32] demonstraram degradação parcial em 3 semanas e total em 9 semanas para uma membrana de colágeno suíno. Apesar disso, os estudos de Wand et al. [34] comprovaram que a reticulação (*crosslinking*) em materiais colagenosos derivados de peixe de água doce melhora sua resistência à degradação, transformando suas cadeias lineares em polímeros tridimensionais com alta massa molar e maior estabilidade térmica. Pelas razões apresentadas, os compósitos reticulados de gelatina e hidroxiapatita testados apresentam potencial de desenvolvimento como membranas de ROG em futuras pesquisas biológicas, incluindo testes pré-clínicos ortotópicos e ensaios clínicos controlados.

CONCLUSÃO

Todos os compósitos testados de gelatina e hidroxiapatita (G1 – 70%G:30%HA, G2 – 80%G:20%HA e G3 – 90%G:10%HA) derivados de tilápia do nilo se mostraram biocompatíveis e parcialmente biodegradáveis. O G1 sugere maior potencial de uso como barreira de membrana em procedimentos clínicos, com seu desempenho biológico associado à maior concentração mineral frente à fase orgânica no biocompósito.

Agradecimento

À Embrapa, pelo suporte técnico e financiamento de parte de pesquisa por meio do projeto "Aproveitamento de resíduos sólidos e efluentes líquidos oriundos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) na produção de coprodutos alimentícios e não alimentícios (cod: 02.11.01.003.00.00).

Referências

- [1] Williams DF. The Williams Dictionary of Biomaterials. 1. ed. Universidade de Liverpool: Liverpool University Press, 1999. 42p.
- [2] Moerbeck-Filho P, Barreto MA, Medrado ARAP, Amaral MTR, Moerbeck LG, Vale DS, et al. Biological Principles of Nanostructured Hydroxyapatite Associated with Metals: A Literature Review. *Insights Biomed.* 2019; 4(3):123-139. <https://doi.org/10.36648/2572-5610.4.3.64>.
- [3] Harris JJ, Lu S, Gabriele P. Commercial challenges in developing biomaterials for medical device development. *Polym Int.* 2018;67(1): 969-974. <https://doi.org/10.1002/pi.5590>.
- [4] Bittencourt RC, Castro-Silva II, Paulo AO, Tavares DS, Granjeiro JM. Preclinical evaluation of a xenogenic hydroxyapatite/collagen-based bone substitute material. *Rev Odonto Cienc.* 2014; 29(1):6-13. <http://dx.doi.org/10.15448/1980-6523.2014.1.12506>.
- [5] Castro-Silva II, Lima FMS, Granjeiro JM. Enxertos ósseos na Odontologia brasileira: cenário, desafios e perspectivas na visão da Gestão em Saúde. *Rev Flum Odontol Int J Sci Dent.* 2014; 1(39):63-71. <https://doi.org/10.22409/ijosd.v1i39.213>.
- [6] Jacob J, More N, Kalia K, Kapusetti G. Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. *Inflamm Regen.* 2018; 38(2):02-11. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0059-8>.
- [7] Pires ALP, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quím. Nova.* 2018; 38(7):957-971. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.
- [8] Caldato K, Naves FKS, Zatta L. Gelatina extraída de escamas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) produzidas no município de Pato Branco: caracterizações e comparações com amostras comerciais. *R. bras. Tecnol. Agroindustr.* 2019; 13(1):2730-2751. <https://doi.org/10.3895/rbta.v13n1.8386>.
- [9] Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019; 23(4):1-11. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>.
- [10] Ouyang QQ, Hu Z, Lin ZP, Quan WY, Deng YF, Li SD, et al. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing. *Int J Biol Macromol.* 2018; 112(1):1191-1198. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.217>.

- [11] Alves APNN, Lima Júnior EM, Piccolo NS, Miranda MJB, Lima-Verde MEQ, Ferreira Júnior AEC, et al. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(1):373-382. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9681-y>.
- [12] Asghari F, Samiel M, Adibkia K, Akbarzadeh A, Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and biotechnology*. 2017; 45(2):185-192. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731>.
- [13] Al-Maawi S, Orłowska A, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ganaati S. In vivo cellular reactions to different biomaterials—Physiological and pathological aspects and their consequences. *Semin. immunol.* 2017; 29(1):49-61. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.06.001>.
- [14] Tesfamariam B. Bioresorbable vascular scaffolds: Biodegradation, drug delivery and vascular remodeling. *Pharmacol. res.* 2016; 107(1):163-171. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.020>.
- [15] ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation. 2. ed. Geneva: International Organization for Standardization, 2007. 21p.
- [16] Pereira LC, Mourão CFAB, Alves ATN, Resende RFB, Uzeda MJPG, Granjeiro JM, et al. In Vitro Physico-Chemical Characterization and Standardized In Vivo Evaluation of Biocompatibility of a New Synthetic Membrane for Guided Bone Regeneration. *Materials*. 2019; 12(1186):1-12. <https://doi.org/10.3390/ma12071186>.
- [17] Sousa-Filho MSM, Melo EF, Ribeiro HL, Feitosa JPA, Souza BWS, Azeredo HMC. Obtenção e Caracterização de Gelatina de Pele de Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em Escala Piloto. 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017. 19p.
- [18] Hampshire VA, Gilbert SH. Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices, *Toxicologic Pathology*. 2019; 47(3):329-338. <https://doi.org/10.1177/0192623318797289>.
- [19] Gomes MJP. Caracterização da biocompatibilidade e biodegradação de hidrogéis com associação de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de subprodutos da indústria avícola. Sobral. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia] - Universidade Federal do Ceará; 2019.
- [20] Jardelino C, Castro-Silva II, Machado CPG, Rocha-Leão MH, Rossi AM, Santos SRA, et al. Biocompatibility analysis of a novel reabsorbable alloplastic membrane composed of alginate-Capsul. *Rev. gaúch. odontol.* 2012;60(4): 419-423.
- [21] Muñoz LC, Cardona-Ramirez S, Silva RF. Comparison of subcutaneous inflammatory response to commercial and engineered zinc hydroxyapatite implants in rabbits. *Arq. bras. med. vet. zootec.* 2019;71(6): 1873-1879. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11407>.
- [22] Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants: a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(28): 6692-6709. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.078>.

- [23] Salgado CL, Teixeira BIB, Monteiro FJM. Biomimetic Composite Scaffold With Phosphoserine Signaling for Bone Tissue Engineering Application. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7(206): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00206>.
- [24] Herrera-Vizcaíno C, Al-Maawi S, Sader R, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Ghanaati S. Modification of collagen-based sponges can induce an upshift of the early inflammatory response and a chronic inflammatory reaction led by M1 macrophages: an in vivo study. *Clin. oral investing* [periódicos na internet]. 2020 Fev [acesso em 27 mar 2020]. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03219-2>.
- [25] Al-Maawi S, Vorakulpipat C, Orlowska A, Zrnc TA, Sader RA, Kirkpatrick CJ, et al. In vivo Implantation of a Bovine-Derived Collagen Membrane Leads to Changes in the Physiological Cellular Pattern of Wound Healing by the Induction of Multinucleated Giant Cells: An Adverse Reaction? *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018;6(104): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00104>.
- [26] Sena LA, Almeida MS, Oliveira Fernandes GV, Guerra Bretaña RM, Castro-Silva II, Granjeiro JM, et al. Biocompatibility of wollastonite-poly(N-butyl-2-cyanoacrylate) composites. *J. biomed. mater. res. B appl. biomater.* 2014;102(6): 1121-1129. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33093>.
- [27] Danieleto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion Capacity of Bovine Cortical Membranes in Critical Defects of Rat Calvaria: Histological and Immunohistochemical Analysis. *International Journal of Biomaterials.* 2020; 2020 (1) 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/6426702>.
- [28] Jung S, Oh HK, Kim MS, Lee K.Y, Park H, Kook MS. Effect of Gellan Gum/Tuna Skin Film in Guided Bone Regeneration in Artificial Bone Defect in Rabbit Calvaria. *Materials.* 2020; 13 (6) 1-9. <https://doi.org/10.3390/ma13061318>.
- [29] Ogawa Y, Azuma K, Izawa H, Morimoto M, Ochi K, Osaki T, et al. Preparation and biocompatibility of a chitin nanofiber/gelatin composite film. *Int. j. biol. macromol.* 2017;104(1): 1882–1889. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.041>.
- [30] Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Natri L. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. *Materials.* 2020; 13 (3) 1-16. <https://doi.org/10.3390/ma13030786>.
- [31] Sancilio S, Gallorini M, Nisio CD, Marsich E, Pietro RD, Schweikl H, et al. Alginate/Hydroxyapatite-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation. *Stem Cells International.* 2018; 2018 (1)1-13. <https://doi.org/10.1155/2018/9643721>.
- [32] Jardelino C, Takamori ER, Hermida LF, Lenharo A, Castro-Silva II, Granjeiro JM. Porcine peritoneum as source of biocompatible collagen in mice. *Acta cir. bras.* 2010;25(4): 332-336. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000400006>.
- [33] Wang J, Hao S, Luo T, Cheng Z, Li W, Gao F, et al. Feather keratin hydrogel for wound repair: preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. *Colloids surf. B.*

2017;149(1): 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>.

[34] Wand JK, Yeo KP, Chun YY, Tan TTY, Tan NS, Angeli V, et al. Fish scale-derived collagen patch promotes growth of blood and lymphatic vessels *in vivo*. *Acta biomater.* 2017;63(1): 246-260. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.001>.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, Maringá, v. 1, n. 1, p. 70-78, jul. 2005.
- AL-MAAWI, S. et al. In vivo cellular reactions to different biomaterials—Physiological and pathological aspects and their consequences. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 49-61, jun. 2017.
- AL-MAAWI, S. et al. In vivo Implantation of a Bovine-Derived Collagen Membrane Leads to Changes in the Physiological Cellular Pattern of Wound Healing by the Induction of Multinucleated Giant Cells: An Adverse Reaction? **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frankfurt, v. 6, n. 104, p. 1-13, ago. 2018.
- ALVES, A. P. N. N. et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Fortaleza, v. 14, n. 3, p. 203-10, mar. 2015.
- ALVES, A. P. N. N. et al. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. **Cell Tissue Bank**, Fortaleza, v. 19, n. 1, p. 373–382, jan. 2018.
- ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. **Annual Review of Materials Research**, Cleveland, v. 31, n. 1, p. 81-110, mar. 2001.
- ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A. R.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 86-100, dez. 2008.
- ARANHA, L.C.; BRAGA, F. J.C. Análise clínico-cirúrgica comparativa de dois produtos de enxertia óssea, existentes no mercado nacional e caracterizados como matriz óssea bovina, tendo como referência uma matriz similar produzida com requisitos específicos. **ImplantNews**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 245-251, mai. 2011.
- ASGHARI, F. et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal**, Tabriz, v. 45, n. 2, p. 185-192, fev. 2016.
- AVÉS, E. P. et al. Recobrimento da liga Ti-6Al-4V com hidroxiapatita pelo método sol-gel e sua aplicação a hastes femorais não-cimentadas. **Cerâmica**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 476-479, dez. 2008.
- BADYLAK, S. F. **Host response to biomaterials: the impact of host response on biomaterial selection**. 1.ed. Pittsburgh: Elsevier, mai. 2015. p. 1-460.
- BANDEIRA, M. G. A.; NASCIMENTO, J. S. Estudo prospectivo relativo à atividade da tilápia para a indústria de alimentos no período de 2006 a 2016. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 552-562, jul./set. 2017.
- BASHA, R. Y.; KUMAR T. S. B. S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone

tissue regeneration. **Materials Science and Engineering**, Chennai, v. 57, n. 1, p. 452-463, dez. 2015.

BEZERRA, L. R. P. S. et al. Tilapia fish skin: A new biological graft in gynecology. **Revista de Medicina da UFC**, Fortaleza, v. 58, n. 2, p. 6, jun. 2018.

BITTENCOURT, R. C. et al. Preclinical evaluation of a xenogenic hydroxyapatite/ collagen-based bone substitute material. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 29, n. 1, p.6-13, nov. 2014.

CALDATO, K.; NAVES, F.K.S.; ZATTA, L. Gelatina extraída de escamas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) produzidas no município de Pato Branco: caracterizações e comparações com amostras comerciais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Pato Branco, v. 13, n.01, p. 2730-2751, jun. 2019.

CAMPOS-JÚNIOR, A. G. C. et al. Análise histológica de enxertos a base de quitosana no reparo do defeito crítico em calota craniana – Estudo em ratos. *In*: SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 18., 2016, Aracaju. **Anais 2016**. Aracaju: UNIT, 2016. Disponível em: <<https://eventos.set.edu.br/index.php/sempeq/article/view/4064/3110>>. Acesso em: 24 mar. 2020.

CARLO, E. C. et al. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 316, p. 492-500, dez. 2007.

CARVALHO, A. C. B. et al. Histomorfometria do tecido ósseo em ratas castradas tratadas com tibolona. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 235-243, jun. 2010.

CARVALHO, A. M. et al. Evaluation of the Potential of Collagen from Codfish Skin as a Biomaterial for Biomedical Applications. **Marine Drugs**, Porto, v. 16, n. 495, p. 1-14, dez. 2018.

CASTRO-SILVA, I. I.; LIMA, F. M. S.; GRANJEIRO, J. M. Enxertos ósseos na odontologia brasileira: cenário, desafios e perspectivas na visão da gestão em saúde. **Revista Fluminense de Odontologia**, Niteroi, v. 1, n. 39, p. 63-71, abr. 2013.

CASTRO-SILVA, I. I. et al. Biotechnological potential of by-products of the Brazilian animal protein industry in the generation of xenogeneic biomaterials for bone regeneration. **Trends in Research**, v. 1, n. 3, p. 1-2, 2018. doi: 10.15761/TR.1000118

CHANG, C-I. et al. Determining the cleavage site for the mature antimicrobial peptide of Nile tilapia b-defensin using 2D electrophoresis, western blot, and mass spectrometry analysis. **Fish & Shell fish Immunology**, Keelung, v. 62, n. 1, p. 41-46, mar. 2017.

CHRISTO, S. N. et al. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, n. 1, p. 1-23, jul. 2015.

COLE, M. A. et al., Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. **Journal of Cell Communication and Signaling**, Ann Arbor, v. 12, n.1, p. 35-43, fev. 2018.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**: fascículo 2, roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. 1Ed. p. 1-131, 2019. Disponível em: <<https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/publicacoes/Fasciculo-02.-Roedores-e-Lagomorfos-2019.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

DANIELETTO-ZANNA, C. F. et al. Osteopromotion Capacity of Bovine Cortical Membranes in Critical Defects of Rat Calvaria: Histological and Immunohistochemical Analysis. **International Journal of Biomaterials**, [s.l.], v. 2020, n.1, p. 1-9, fev. 2020.

DIAS, M. T. M. et al. Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertility and Sterility**, New York, v.112, n. 1, p. 174-176, jul 2019.

ELANGO, J. et al. Rheological, biocompatibility and osteogenesis assessment of fish collagen scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 91, n. 1, p. 51-59, out. 2016.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, Tel Aviv, v. 10, n. 1, p. 01-104, mar. 2017.

EL-RASHIDY, A. A. et al. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v.79, n. 1, p. 618-626, ago. 2015.

ERMITA, D. A. C. F. et al. Biocompatibilidade in vivo de compósitos de hidroapatita sintética associada à nanopartículas de magnetita e ciprofloxacina. **Investigação**, Viçosa, v. 17, n. 4, p. 01-14, fev. 2018.

FANG, Z. et al. Hierarchical structure and cytocompatibility of fish scales from *Carassius auratus*. **Materials Science and Engineering C**, Beijing, v. 43, n. 1, p. 145–152, out. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: meeting the sustainable development goals. Rome. p. 01-211, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2019.

FARZAD, R. et al. Trace minerals in tilapia fillets: Status in the United States marketplace and selenium supplementation strategy for improving consumer's health. **PLoS One**, San Francisco, v.14, n. 6, p. 1-17, jun. 2019.

FATTAHIAN, N, H.; MANSOURI, K.; MANSOURI, N. Biomaterials, substitutes, and tissue engineering in bone repair: current and future concepts. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 1, n. 1, p. 01-13, jul. 2017.

FELICIAN, F. F. et al. Collagen from marine biological sources and medical applications. **Chemistry & biodiversity**, Jiangsu, v. 15, n. 5, p. 1-18, mai. 2018.

FERREIRA, S. C. S. **Novos biomateriais poliméricos para implantes ósseos**. 2016. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2016.

FRANZ, S. et al. Immune responses to implants: a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, Leipzig, v. 32, n. 28, p. 6692-6709, jun. 2011.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 1531-1546, nov. 2003.

GIMENEZ, C. E. A. et al. A pele da tilápia no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro grau, além de mais eficiente, é de baixíssimo custo. **Revista enfermagem atual**, Assunção, v. 87, n. 1, p. 4, abr. 2019.

GOMES, M. J. P. **Caracterização da biocompatibilidade e biodegradação de hidrogéis com associação de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de subprodutos da indústria avícola**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal Do Ceará, Sobral, 2019.

GROSSI, J. R. A. et al. Tissue reaction of deproteinized bovine bone matrix grafting in ectopic site: histological study on sheep. **Cell and Tissue Banking**, Sordrecht, v. 17, n. 1, p. 689-697, dez. 2016.

GULICK, L. V. et al. Age-related changes in molecular organization of type I collagen in tendon as probed by polarized SHG and Raman microspectroscopy. **Scientific Reports**, Reims, v. 13, n. 9, p.1-12, mai. 2019.

HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 51, n. 1, p. 24-33, jun. 2016.

HAMPSHIRE, V. A.; GILBERT, S. H. Refinement, Reduction, and Replacement (3R) strategies in preclinical testing of medical devices. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 47, n. 3, p. 329-338, out. 2019.

HARRIS, J.J.; LU, S.; GABRIELE, P. Commercial challenges in developing biomaterials for medical device development. **Polymer International**, Telford, v. 67, n 1, p. 969–974, mar. 2018.

HERRERA-VIZCAÍNO, C. et al. Modification of collagen-based sponges can induce an upshift of the early inflammatory response and a chronic inflammatory reaction led by M1 macrophages: an in vivo study. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v.1, n.1, p. 1-16, fev. 2020.

HUANG, G. et al. Beyond knockout rats New: insights into finer genome manipulation in rats. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 10, n. 7, p. 1059-1066, abr. 2011.

ILYAS, K. et al. Microwave-assisted synthesis and evaluation of type 1 collagen–apatite

composites for dental tissue regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, Lancaster, v. 33, n. 1, p. 103–115, mai. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM): produção da aquicultura, tabela 04, 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em: 20 mai. 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION–ISO. ISO 10993-6 Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation. 2007. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/61089.html>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

ITUASSÚ, D. R.; ARAGÃO, J. C. Sistema treino e visita de piscicultura em mato grosso, brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 163-172, ago. 2018.

JACOB, J. et al. Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. **Inflammation and Regeneration**, Ahmedabad, v. 38, n. 02, p. 02-11, fev. 2018.

JARDELINO, C. et al. Biocompatibility analysis of a novel reabsorbable alloplastic membrane composed of alginate-Capsul. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 60, n. 4, p. 419-423, dez. 2012.

JARDELINO, C. et al. Porcine peritoneum as source of biocompatible collagen in mice. **Acta cirurgica brasileira**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 323-336, ago. 2010.

JEONG, J. et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomaterials Research**, Seoul, v. 23, n.1, p. 1-11, jan. 2019.

JUNG, S. et al. Effect of Gellan Gum/Tuna Skin Film in Guided Bone Regeneration in Artificial Bone Defect in Rabbit Calvaria. **Materials**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 1318, mar. 2020.

KAKU, M.; YAMAUCHI, M. Mechano-regulation of Collagen Biosynthesis in Periodontal Ligament. **Journal of Prosthodontic Research**, Lahore, v. 58, n. 4, p. 193–207, out. 2014.

KANE, R.J. et al. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 16-25, jan. 2015.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 518-522, jan. 2000.

KEENAN, S. W. et al. Heterogeneous bioapatite carbonation in western painted turtles is unchanged after anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 233, n. 1, p. 74-83, mar. 2019.

KHORRAMIROUZ, R. et al. A novel surgical technique for a rat subcutaneous implantation of a tissue engineered scaffold. **Acta Histochemica**, Jena, v. 120, n. 3, p. 282–291, mar. 2018.

KIM, Y. K.; CHEN, E. Y.; LIU, W. F. Biomolecular strategies to modulate the macrophage response to implanted materials. **Journal of Materials Chemistry B**, Washington, v. 4, n. 9, p. 1559–1748, set. 2016.

- KUMAR, B.; RANI, S. Technical note on the isolation and characterization of collagen from fish waste material. **Journal of food science and technology**, Haryana, v. 54, n. 1, p. 276–278, jan. 2017.
- KWEE, B. J; MOONEY, D. J. Manipulating the Intersection of Angiogenesis and Inflammation. **Annals of Biomedical Engineering**, New York, v.43, n. 3, p. 628–640, out. 2015.
- LI, D. et al. Evaluation of biocompatibility and immunogenicity of micro/nanofiber materials based on tilapia skin collagen. **Journal of Biomaterials Applications**, Lancaster, v. 33, n. 8, p. 1118-1127, fev.2019.
- LI, Z. R. et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, Zhoushan, v. 31, n. 1, p. 103-113, mai. 2013.
- LIMA, I. R. et al. Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: An in vitro multiparametric study on biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 1, n. 1, p. 351-358, mai. 2011.
- LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Limeira, v. 16, n. 1, p. 10-17, set. 2017.
- LIU, Y. et al. Dietary oils modify lipid molecules and nutritional value of fillet in Nile tilapia: A deep lipidomics analysis. **Food Chemistry**, Barking, v. 277, n. 1, p. 515-523, 2019.
- LOMELINO, R. O. et al. The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (bTCP/HA 70:30) granules increases bone repair. **Revista de Ciência dos Materiais: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 781-788, dez. 2012.
- LOPES, J. R.; OLIVEIRA, J. A. C.; ESTEVES A. A. Síntese e caracterização de pós de hidroxiapatita [CA₁₀(PO₄)₆(OH)₂] obtidas a partir do processo sol-gel. **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, [s.l.], v. 06, n. 08, p. 55-72, jan./jun. 2015.
- LUSTOSA-NETO, A. D. et al. Almôndegas de pirarucu e tilápia nilótica: caracterização e aplicação na merenda escolar **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 1-12, 2018.
- LV, L.C. et al. Fish gelatin: The novel potential applications. **Journal of Functional Foods**, Nanchang, v. 63, n. 1, p. 1-14, dez. 2019.
- MAIA, M. et al. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. **Revista Brasileira Cirurgia Plástica**. São Paulo, v. 25, n. 3, p. 566-572, mai. 2010.
- MARIANI, E. et al. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? **International Journal of Molecular Sciences**, Bolonha, v. 20, n. 636, p. 1-42, 1 fev. 2019.
- MATA, A. et al. New Bioengineering Breakthroughs and Enabling Tools in Regenerative

Medicine. **Current Stem Cell Reports**. Londres, v. 3, n. 1, p.83-97, mai. 2017.

MATA, D. A. et al. Limnologia e sua Correlação com a Produtividade da Tilápia *Oreochromis niloticus*. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v.14, n. 3, p.254-265, set. 2018.

MEAZZA, K. **Avaliação do beneficiamento de resíduos do pirarucu para a produção de biocompósitos a base de hidroxiapatita e fibra de colágeno**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

MEDEIROS-JÚNIOR, E. F.; CORDEIRO, G. L.; SILVA, M. J. L. Qualidade da água em viveiros de Tambaqui colossoma macropomum (CUVIER, 1818), em são gabriel da cachoeira, amazonas, brasil. **Revista de Educação Ciência e Tecnologia do IFAM**. São Gabriel da Cachoeira, v. 12, n. 1, p. 2238-4286, jun. 2018.

MELO, E. F. **Biocompósitos de gelatina de pele e hidroxiapatita de escamas de resíduos do beneficiamento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MIRANDA, M. C. R. **Desenvolvimento e estudo toxicológico em métodos alternativos dos compósitos à base de látex natural e fosfatos de cálcio para reparação óssea**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

MIRANDA, M. J. B.; BRANDT, C. T. Nile tilapia skin xenograft versus silver-based hydrofiber dressing in the treatment of second-degree burns in adults. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 79-85, nov. 2019.

MIRANDA, M. J. B.; BRANDT, C. T. Xenoenxerto (pele da Tilápia-do-Nilo) e hidrofibra com prata no tratamento das queimaduras de II grau em adultos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 34, n. 1, p 79-85, nov. 2019.

MOERBECK-FILHO, P. M. et al. Biological Principles of Nanostructured Hydroxyapatite Associated with Metals: A Literature Review. **Insights in Biomedicine**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 13, set. 2019.

MUKHERJEE, S. et al. Mesenchymal stem cell-based bioengineered constructs: foreign body response, cross-talk with macrophages and impact of biomaterial design strategies for pelvic floor disorders. **Interface Focus**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 1-15, jun. 2019.

MUÑOZ, L. C., CARDONA-RAMIREZ S., SILVA R. F. Comparison of subcutaneous inflammatory response to commercial and engineered zinc hydroxyapatite implants in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.71, n.6, p.1873-1879, jun. 2019.

NARAYAN, R. et al. Ectopic vascularized bone formation by human mesenchymal stem cell microtissues in a biocomposite scaffold. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 661-670, out. 2017.

NARAYANAN, G. et al. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 107, n.1, p.

247–276, abr. 2016.

NUNES, R. S.; LOPES, K. K. M. CURATIVOS EM QUEIMADOURAS DE TERCEIRO GRAU. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, [s.l.], v. 07, n. 01, p.56-68, nov. 2018.

OGAWA, Y. et al. Preparation and biocompatibility of a chitin nanofiber/gelatin composite film. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 104, n.1, p.1882-1889, fev. 2017.

OLIVEIRA, V. M. et al. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides-a review with emphasis on byproducts of fish. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 56-68, jul. 2017

ORLANDI-NETO, A. et al. Biology of non-native species (*Rhaphiodon vulpinus* Agassiz, 1829) (Characiformes, Cynodontidae) in a cage fish farm area, Upper Paraná River Basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 31, n. 9, p. 1-10, fev. 2019.

OUYANG, Q. Q. et al. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 112, n. 1, p. 1191-1198, jun. 2018.

PAL, A. et al. Synthesis of hydroxyapatite from *Latescalcarifer* fish bone for biomedical applications. **Materials Letters**, [s.l.], v.203, n. 1, p. 89–92, mai. 2017.

PARK, S. B. et al. Biopolymer-based functional composites for medical applications. **Progress in Polymer Science**, Seoul, v. 68, n. 1, p. 77–105, mai. 2017.

PAULO, A. O. et al. Repair of Critical-Size Defects with Autogenous Periosteum-Derived Cells Combined with Bovine Anorganic Apatite/Collagen: An Experimental Study in Rat Calvaria. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 4, p. 322-328, jan. 2011.

PEREIRA, L. C. et al. In Vitro Physico-Chemical Characterization and Standardized In Vivo Evaluation of Biocompatibility of a New Synthetic Membrane for Guided Bone Regeneration. **Materials**, [s.l.], v. 12, n. 7, p. 1-12, abr. 2019.

PINTO, B. V. V. et al. O resíduo de pescado e o uso sustentável na elaboração de coprodutos. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 1-15, nov. 2017.

PIRES, A. L. P.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 957-971, ago. 2015.

POGREBNJAK, A. et al. Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles. **Ceramics International**, [s.l.], v. 45, n. 6, p. 7504-7514, abr. 2019.

POLAZ, C. N. M.; RIBEIRO, K. T. Conservação de Peixes Continentais e Manejo de Unidades de Conservação. **Biodiversidade Brasileira**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-3, mai. 2017.

PON-ON, W. et al. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 62, n. 1, p. 183–

189, jan. 2016.

RAGHIANTE, F. et al. Francisella spp. em tilápias no Brasil: Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 119-130, mar. 2017.

RAHIMNEJAD, M.; DERAKHSHANFAR, S.; ZHONG, W. Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care. **Burns & Trauma**, Winnipeg, v. 5, n. 4, p. 1-9, jan. 2017.

RAHMANIAN-SCHWARZ, A. et al. In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. **Journal of biomedical materials research Part A**, Hoboken, v. 102, n. 4, p. 1173-1179, abr. 2014.

RIBEIRO, N. et al. A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. **Biofabrication**, Porto, v. 6, n.3, p. 035015, jun. 2014.

SALGADO, C. L. et al. Biodegradation, biocompatibility, and osteoconduction evaluation of collagen-nanohydroxyapatite cryogels for bone tissue regeneration. **Journal of biomedical materials research Part A**, Hoboken, v. 104, n. 1, p. 57-70, jul. 2016.

SALGADO, C.L; TEIXEIRA, B.I.B.; MONTEIRO, F.J.M. Biomimetic Composite Scaffold With Phosphoserine Signaling for Bone Tissue Engineering Application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s.l.], v. 7, n. 206, p. 1-16, set. 2019.

SANCILIO, S. et al. Alginate/hydroxyapatite-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering improve dental pulp biomineralization and differentiation. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2018, n.1, p. 1-13, ago. 2018.

SANTOS, H. F. W. et al. Análise histológica de enxertos baseados na tríplice de quitosana, fibroína e hidroxiapatita no reparo do defeito crítico em calota craniana – estudo em ratos. *In: SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES*, 18., 2016, Aracaju. **Anais 2016**. Aracaju: UNIT, 2016. Disponível em: <<https://eventos.set.edu.br/index.php/sempeq/article/viewFile/4002/3109>>. Acesso em: 24 de mar. 2020

SANTOS-FILHO, L.G. et al. Utilização de indicadores de viabilidade econômica na produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em sistema de recirculação: estudo de caso de uma piscicultura de pequena escala em Parnaíba-PI. **Organizações Rurais e Agroindustriais/Rural and Agro-Industrial Organizations**, Teresina, v. 18, n. 4, p. 304-314, mai. 2016.

SBRICOLI, L. et al. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. **Materials**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 786, fev. 2020.

SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. R. V. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**: Texto para Discussão, No. 2328. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Rio de Janeiro, ago. 2017. E-book. Disponível em: <https://www.econstor.eu/bitstream/10419/177544/1/td_2328.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2020

SENA, L. A. et al. Biocompatibility of wollastonite-poly (N-butyl-2-cyanoacrylate) composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 102, n. 6, p. 1121-1129, fev. 2014.

SHEIKH, Z. et al. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. **Materials**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 5671-5701, set. 2015.

SILVA, G.C.O. et al. Obtenção e caracterização físico-química e microbiológica da gelatina de resíduos de matrinxã (*Brycon amazonicus*) e tambaqui (*Colossoma macroponum*). **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, [s.l.], v. 6, n. 01, p.74-84, jun. 2018.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Chemical characteristics and functional properties of collagen. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 530-539, jun. 2012.

SIVARAMAN, K; MUTHUKUMAR, K.; SHANTHI, C. A potential bioactive peptide candidate for biomaterial and tissue engineering applications. **Life Sciences**, [s.l.], v. 226, n. 1, p. 140-148, jun. 2019.

SONG, W. K. et al. Physicochemical and biocompatibility properties of type I collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications. **Marine drugs**, [s.l.], v. 17, n.3, p. 137, mar. 2019.

SOUSA, M. V. S. et al. Studi of LCC incorporation in Chitosan Membrane. **Brazilian Journal of health Review**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 2762-2777, ago. 2019.

SOUSA, W. J. B. et al. Membranes polyhydroxybutyrate with hydroxyapatite for use as biomaterials. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 22, n.4, p. 1-10, out. 2017.

SOUSA-FILHO, M. S. M. et al. **Obtenção e Caracterização de Gelatina de Pele de Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em Escala Piloto**: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 1. Ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, set. 2017.

SU, Y. F. et al. Spines of the porcupine fish: Structure, composition, and mechanical properties. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s.l.], v, 73, n. 1, p. 38-49, fev. 2017.

TANG, J.; SAITO, T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative study. **BioMed Research Internatinal**, Londres, v. 1, n.1, p. 1-8, set. 2015.

TESFAMARIAM, B. Bioresorbable vascular scaffolds: Biodegradation, drug delivery and vascular remodeling. **Pharmacological Research**, London, v.107, n. 1, p.163-171, mai. 2016.

THANKAM, F. G. et al. Collagen I: a kingpin for rotator cuff tendon pathology. **American Journal of Translational Research**, Omaha, v. 10, n. 11, p. 3291-3309, nov. 2018.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 224, n. 1, p. 160-171, jun. 2017.

VISHWAKARMA, A. et al. Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 34, n. 6, p. 470-482, abr. 2016.

WANG, J. et al., Feather keratin hydrogel for wound repair: preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 149, n. 1, p. 341-350, out. 2017.

WANG, J. K. et al. Fish scale-derived collagen patch promotes growth of blood and lymphatic vessels in vivo. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 246-260, nov. 2017.

WILLIAMS, D. F (ed.). **The Williams Dictionary of Biomaterials**. 1. ed. Universidade de Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, Guildford, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, abr. 2008.

YAZDIMAMAGHANI, M. et al. Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, Lausanne, v. 71, n. 1, p. 1253-1266, nov. 2017.

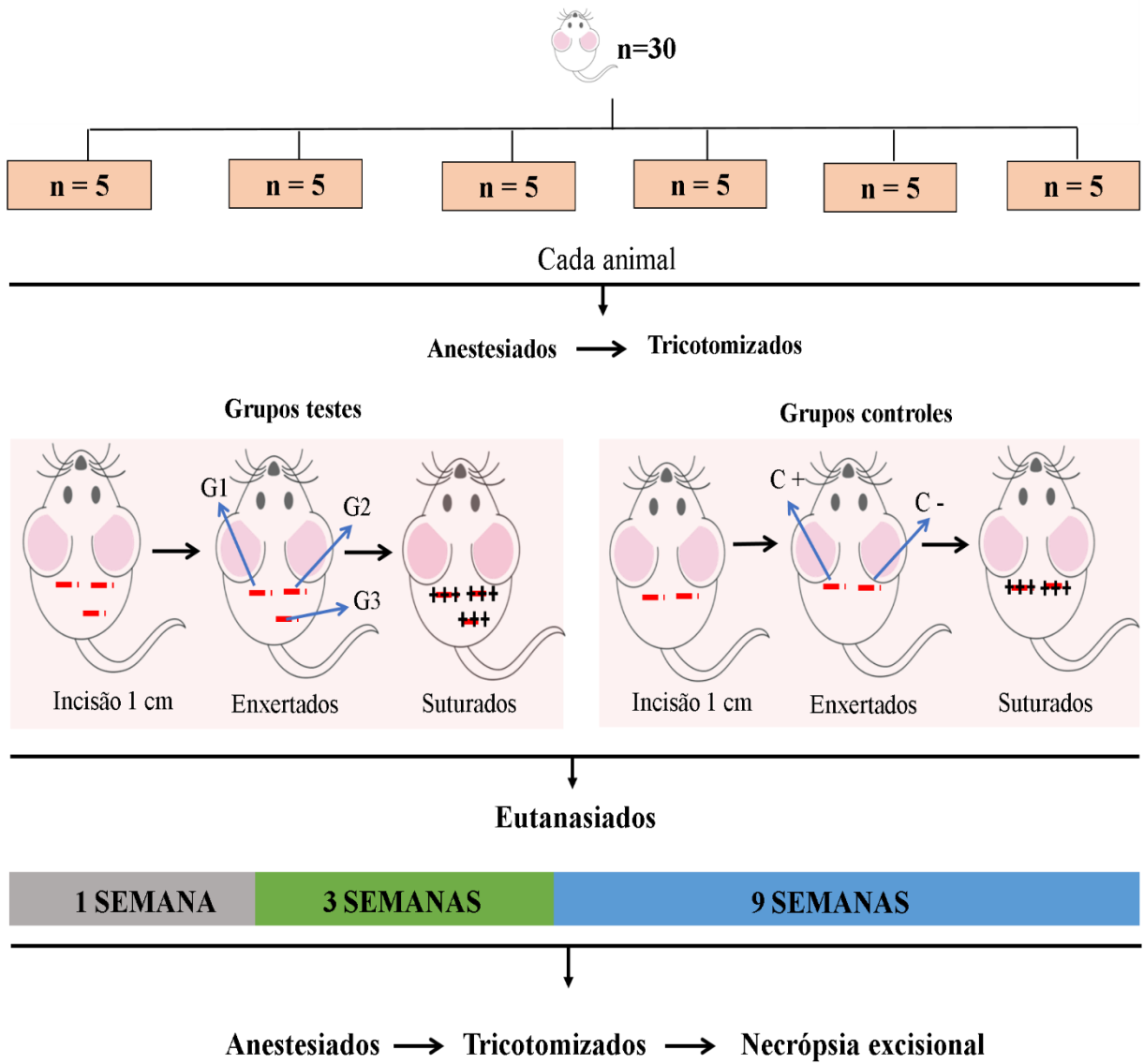
ZHANG, D. et al. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. **Bioactive Materials**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 129-138, mar. 2018.

ZHOU, G.; GROTH, T. Host Responses to Biomaterials and Anti-Inflammatory Design-a Brief Review. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 18, n. 8, p. 1-15, jun. 2018.

ZHU, D. et al. Mechanical Strength, Biodegradation, and in Vitro and in Vivo Biocompatibility of Zn Biomaterials. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 6809-6819, jan. 2019.

ZIMMERMANN, E. A.; BUSSE, B.; RITCHIE, R. O. The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. **Bonekey Reports**, Hamburg, v. 4, n.1, p. 1-13, set. 2015.

APÊNDICE A- DESENHO EXPERIMENTAL DO ENSAIO DE IMPLANTAÇÃO A NECRÓPSIA.

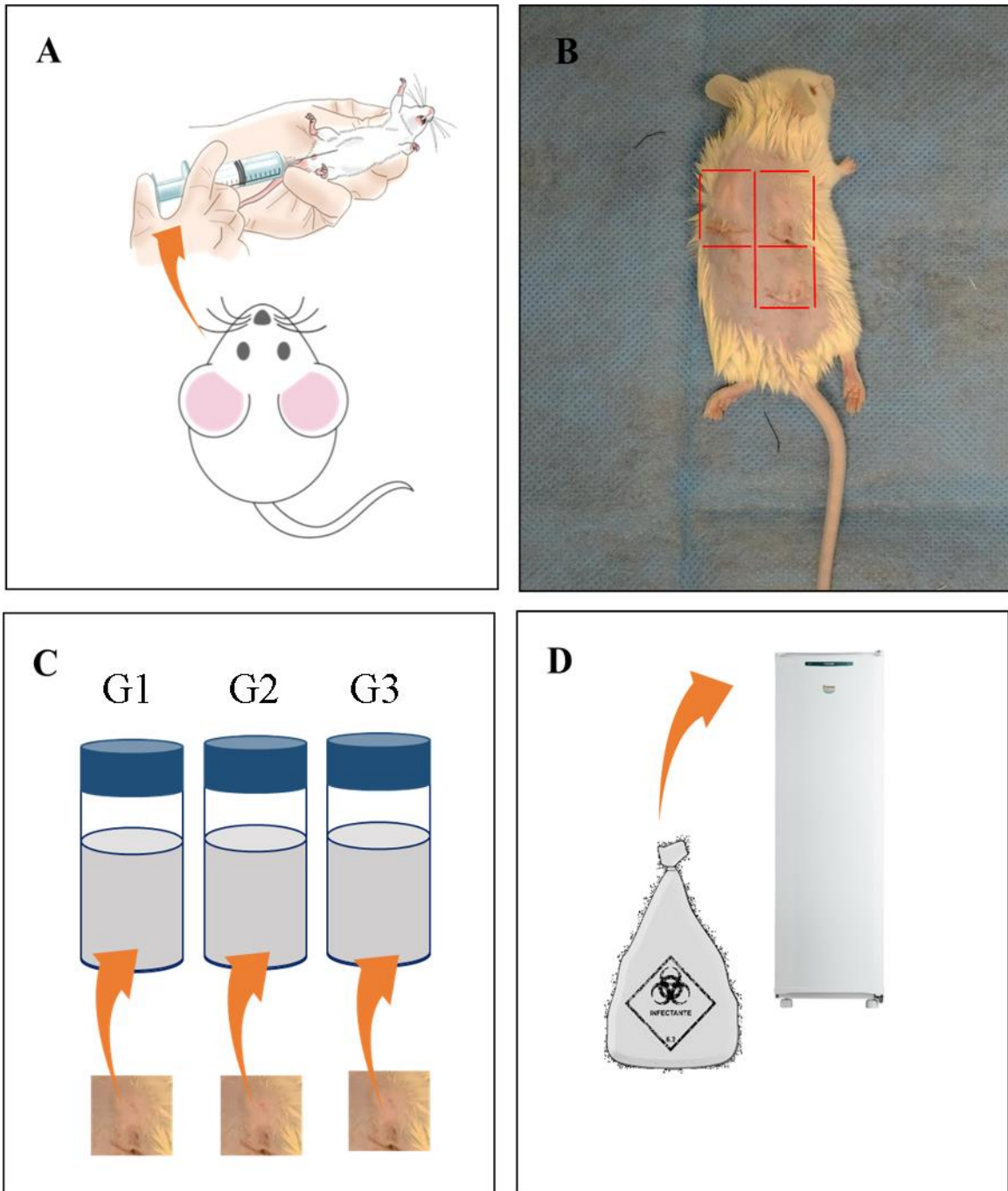


APÊNDICE B- SEQUÊNCIA DOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DOS MATERIAS TESTES.



Legenda: A- Anestesia de cada animal. B- Tricotomização, antissepsia da região dorsal dos animais. C- Incisão de 1 cm de comprimento, de acordo com a ISO 10993-6, 2007. D- Divulsão do tecido subcutâneo. E- Implantação dos biocompósitos. F- Animal enxertado. G- Sutura das incisões. H- Material previamente esterilizado e utilizado no procedimento cirúrgico.

APÊNDICE C- ETAPAS DOS PROCEDIMENTOS DE NECRÓPSIA EXCISIONAL.



Legenda: A- Eutanásia dos animais por uma overdose de agente anestésico, via intraperitoneal. B- Tricotomização da região tronco-dorsal e necrópsia excisional da região enxertada. C- As amostras foram colocadas em frascos com solução de formol 4% tamponada. D- Descarte das carcaças em saco plástico de risco biológico e armazenado em um freezer vertical.

APÊNDICE D - RESPOSTA DA AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MATERIAIS IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS PARA O TEMPO EXPERIMENTAL DE 1 SEMANA.

Critérios	Pontuações por tempo experimental																								
	G1					G2					G3					C+				C-					
Neutrófilos	3	3	4	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Linfócitos	2	1	3	1	2	1	3	1	1	1	3	2	3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Células gigantes de corpo estranho	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Subtotal (x2)	12,4					9,6					10,4					2,8				2,8					
Neovascularização	1	0	2	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	0	0	1	0	1	1	1	1	2
Fibrose	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	2	1	1	1	0	0	1	1	2	1	2	2	2
Subtotal	2,2					2,6					2,2					1				3					
Total	14,6					12,2					12,6					3,8				5,8					
Padrão de Irritação	8,8					6,4					6,8					0				0					
	Pouco irritante					Pouco irritante					Pouco irritante					Não irritante				-					

*Padrão de irritação negativo pontuado como zero, como recomenda a norma ISO 10993-6 (2007).

APÊNDICE E - RESPOSTA DA AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCMPATIBILIDADE DE MATERIAIS IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS PARA O TEMPO EXPERIMENTAL DE 3 SEMANAS.

Critérios	Pontuações por tempo experimental																											
	G1					G2					G3					C+				C-								
Neutrófilos	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfócitos	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	3	2	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Macrófagos	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Células gigantes de corpo estranho	3	2	1	2	2	1	2	2	1	3	2	2	1	2	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal (x2)	7,6					5,2					5,2					7,6				1,6								
Neovascularização	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Fibrose	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	2	2	1	2	3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Subtotal	4,0					4,0					3,2					1,6				2,4								
Total	11,6					9,2					8,4					9,2				4								
Padrão de Irritação	7,6					5,2					4,4					5,2				0								
	Pouco irritante					Pouco irritante					Pouco irritante					Pouco irritante				-								

*Padrão de irritação negativo pontuado como zero, como recomenda a norma ISO 10993-6 (2007).

APÊNDICE F - RESPOSTA DA AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCMPATIBILIDADE DE MATERIAIS IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS PARA O TEMPO EXPERIMENTAL DE 9 SEMANAS.

Critérios	Pontuações por tempo experimental																											
	G1					G2					G3					C+				C-								
Neutrófilos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfócitos	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Macrófagos	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células gigantes de corpo estranho	1	1	2	1	2	0	1	2	1	2	2	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal (x2)	4					2,8					4,4					2				1,2								
Neovascularização	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
Fibrose	2	4	2	3	3	1	2	3	4	3	1	1	3	3	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2
Subtotal	4					3,4					2,2					1,6				2,8								
Total	8					6,2					6,6					3,6				4								
Padrão de Irritação	4					2,2					2,6					0				0								
	Pouco irritante					Não irritante					Não irritante					Não irritante				-								

*Padrão de irritação negativo pontuado como zero, como recomenda a norma ISO 10993-6 (2007).

ANEXO A - DIRETRIZES PARA AUTORES – PERIÓDICO QUALIS CAPES A3.



MATERIALS TODAY COMMUNICATIONS

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 2352-4928

DESCRIPTION

Materials Today Communications (Journal Impact Factor* 1.859, CiteScore 1.98) is a primary research journal covering all areas of materials science. The journal offers the materials community a fast, innovative, efficient and flexible route for the publication of original research and reviews.

Highly experienced editorial teams from *Materials Today Communications* and the Supporting Journals ensure that all papers are rigorously and fairly assessed; providing rapid publication and high visibility of scientifically robust work.

Materials Today Communications publishes original research papers and reviews of any length, and follows a hybrid publication model, providing authors with the option to publish their papers Open Access for a fee, or publish for free via the Subscription route.

Articles transferred to *Materials Today Communications* after peer review may be offered immediate publication without additional review**.

*Journal Citation Reports (Clarivate Analytics, 2019)**This process is referred to as "Transferred Acceptance" or "Transfer Recommended Accept". Acceptance is provisional and depends on satisfactorily addressing any Editor and/or Referee comments, as judged by the Editors of *Materials Today Communications*. "Transfer Recommended Accept" cannot be implemented for articles transferred without peer-review comments. For more information on "Transfer Recommended Accept"

and other types of article transfer available within Elsevier's materials science journals, visit <https://www.materialstoday.com/article-transfer-service/>.

IMPACT FACTOR

2018: 1.859 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Science Citation Index Expanded

INSPEC

GUIDE FOR AUTHORS

BEFORE YOU BEGIN

Please note that all submissions to Materials Today Communications (MT Comms) must have been suggested for transfer by one of the journal's partner publications (listed here: <http://www.journals.elsevier.com/materials-today-communications/editorial-board>). The author must have used the direct transfer service offered by these journals as MT Comms does not accept direct submissions. All other submissions will not be considered by the journal.

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all

authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information. *Elsevier Researcher Academy*

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/materials-today-communications> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:[dataset]

[6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

RESEARCH DATA

This journal supports and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data Linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC:734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to Mendeley Data. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, authors are required to include a 'Data availability' section in their manuscript prior to their reference section. The intention of this section is to provide readers with information on where they can obtain the research data required to reproduce the work reported in the manuscript. This may also be a requirement of your funding body or institution. For more information on specific requirements, please visit the Materials Today Data Statement page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online

version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

ANEXO B – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 4 DE JUNHO DE 2019.

05/06/2019

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 4 DE JUNHO DE 2019 - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 4 DE JUNHO DE 2019 - DOU - Imprensa Nacional

<i>Meleagris gallopavo</i>	PERU	SIM
<i>Numida meleagris</i>	GALINHA	SIM
	D'ANGOLA	
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	COELHO	SIM
<i>Ovis aries</i>	OVINO	SIM
<i>Phasianus colchicus</i>	FAISÃO	SIM
<i>Struthio camelus</i>	AVESTRUZ	SIM
<i>Sus scrofa</i>	SUÍNO, JAVALI	SIM
	EUROPEU	

Espécies animais aquáticas introduzidas no Território Nacional

Espécie (nome científico)	Nome Comum	Formam
		populações
		espontâneas?
<i>Aristichthys nobilis</i>	Carpa-cabeçuda	SIM
<i>Artemia franciscana</i>	Artêmia	SIM
<i>Clarias gariepinus</i>	Bagre-africano	SIM
<i>Crassostrea gigas</i> (= <i>Magallana gigas</i>)	Ostra-do-Pacífico	SIM
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa-capim	SIM
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa-comum	SIM
<i>Gracilaria spp.</i> (*)	Macroalga	SIM
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Carpa prateada	SIM
<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre-americano	SIM
<i>Kappaphycus alvarezii</i> (*)	Macroalga	NÃO
<i>Lepomis gibbosus</i>	Perca-sol	SIM
<i>Lepomis macrochirus</i>	Perca-sol de guelras azuis	SIM
	ou bluegill	
<i>Lithobates catesbeianus</i> (= <i>Rana catesbeiana</i>)	Rã-touro-americana	SIM
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Camarão-branco-do-	SIM
	Pacífico	
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Camarão-da-Malásia	SIM
<i>Micropterus salmoides</i>	Achigã ou Black bass	SIM
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta-arco-iris	SIM
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia-do-Nilo	SIM
<i>Oreochromis spp.</i>	Outras tilápias e seus	SIM
	híbridos	
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Peixe-panga	SIM
<i>Sarotherodon spp.</i>	Outras tilápias e seus	SIM
	híbridos	
<i>Tilapia rendalli</i>	Tilápia-do-Congo	SIM
<i>Tilapia spp.</i>	Outras tilápias e seus	SIM
	híbridos	

ANEXO C - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA, UFC).



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurocêlio Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Análise *in vivo* da biocompatibilidade e biodegradação de biocompósitos de hidroxiapatita e gelatina de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**, registrada com o nº **01/19**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 11/06/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/06/2019 até 01/06/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogênico Swiss
Nº de animais	Camundongos: 90
Peso/Idade	Camundongos: 30g/2-3meses
Sexo	♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 11 de junho de 2019.

Profª. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

ANEXO D – AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA POR PARÂMETROS DE PONTUAÇÃO (COM PEQUENAS MODIFICAÇÕES BASEADAS NA ISO 10993-6, 2007) PARA AVALIAÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA, REPARATIVO, INTEGRIDADE DOS ENXERTOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS.

Parâmetros de resposta inflamatória	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Neutrófilos	0	Raros, 1-5/pc	5-10/pc	Infiltração intensa ou até 50%/pc	Sobrelotação ou > 50%/pc
Linfócitos	0	Raros, 1-5/pc	5-10/pc	Infiltração intensa ou até 50%/pc	Sobrelotação ou > 50%/pc
Macrófagos	0	Raros, 1-5/pc	5-10/pc	Infiltração intensa ou até 50%/pc	Sobrelotação ou > 50%/pc
Células Gigantes do tipo corpo estranho	0	Raros, 1-2/pc	3-5/pc	Infiltração intensa ou até 50%/pc	Sobrelotação ou > 50%/pc

Pc: por campo (400X).

Parâmetros de resposta reparativa	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Neovascularização	0	Proliferação capilar mínima, focal, 1-3 brotos	Grupos de 4-7 capilares com estruturas fibroblastóides de suporte	Banda larga de capilares com estruturas de suporte ou até 50%/ pc	Banda extensa de capilares com estruturas fibroblastóides de suporte ou >50%/pc
Fibrose ou tecido conjuntivo	0	Banda estreita ou tecido conjuntivo frouxo até 50%/ pc	Banda de espessura moderada ou tecido conjuntivo frouxo de 50-100%/pc	Banda espessa ou tecido conjuntivo denso até 50%/pc	Banda extensa ou tecido conjuntivo denso >50%/pc

Pc: por campo (400X).

Padrão de integridade do enxerto	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Presença do material	0 (100% degradado)	Mínima (até 25%)	Leve (26-50%)	Moderado (51-75%)	Quase total (76-100%)

Pc: por campo (400X).

Fonte: adaptado de ISO 10993: 6, anexo E, 2007.

**ANEXO E – AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA BIOCAMPATIBILIDADE
(COM PEQUENAS MODIFICAÇÕES BASEADAS NA ISO 10993-6, 2007) DOS
ENXERTOS EM MODELO SUBCUTÂNEO.**

Critérios	Pontuações por tempo experimental				
	G1	G2	G3	C+	C-
Neutrófilos	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental
Linfócitos	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental
Macrófagos	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental
Células gigante de corpo estranho	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental
Subtotal (x2)	Soma de critérios de inflamação	Soma de critérios de inflamação	Soma de critérios de inflamação	Soma de critérios de inflamação	Soma de critérios de inflamação
Neovascularização	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental
Fibrose	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental	Média/condição experimental
Subtotal	Soma de critérios de reparo	Soma de critérios de reparo	Soma de critérios de reparo	Soma de critérios de reparo	Soma de critérios de reparo
TOTAL	Soma dos subtotais	Soma dos subtotais	Soma dos subtotais	Soma dos subtotais	Soma dos subtotais

Calculo: Amostra teste – Controle negativo; No caso de diferença negativa, considera-se resultado como zero. De acordo com este resultado, comparar a uma das faixas a seguir para determinar o ranking de irritação de cada produto.

Sob condições experimentais, a amostra teste será considerada:

- não irritante (0,029);
- pouco irritante (3,0-8,9);
- moderadamente irritante (9,0-15,0); ou
- severamente irritante (>15).

Em relação ao tecido quando comparada ao controle negativo.

Fonte: adaptado de ISO 10993: 6, anexo E, 2007.

ANEXO F – INSTRUÇÕES PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO (PPGB).

Art. 42º. A avaliação do exame de qualificação verificará os seguintes critérios:

I - Apresentação do tema, revisão ampla, atualizada e crítica da literatura e delimitação do problema; II - Argumentação quanto à justificativa denotando a relevância teórica e prática da proposta;

III - Redação clara e precisa dos objetivos e sua coerência com o problema da pesquisa;

IV - Coerência metodológica relativamente aos objetivos de pesquisa, e uso apropriado dos materiais e métodos, na organização e na análise de dados;

V - Uso da linguagem consoante a norma culta da língua e o estilo de redação científica;

VI - Habilidade de síntese, coerência e coesão lógica do texto (ligação entre capítulos/seções/frases/parágrafos);

VII - Viabilidade do cronograma do projeto tendo em vista o prazo de conclusão do curso de mestrado (24 meses).

Art. 55º. A Comissão Examinadora que julgará a dissertação será constituída de especialistas credenciados com título de doutor ou equivalente, aprovada pelo Colegiado do Programa e designada pelo Coordenador, sendo composta de no mínimo 3 (três) membros, sendo um externo ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Parágrafo único - Poderão participar da Comissão Examinadora professores ativos e aposentados do Programa ou de outros Programas de Pós-Graduação afins, além de profissionais com titulação pertinente.

Art. 56º. O trabalho de dissertação deve seguir as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC, apresentando: introdução, objetivos, referencial teórico, metodologia, resultados e conclusão.

§ 1º. O trabalho de dissertação também poderá constar de um artigo em inglês, precedido de introdução, objetivos e referencial teórico em português e de acordo com as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC.

§ 2º. A apresentação oral da defesa de dissertação deverá ser realizada no idioma português e o aluno terá 45 minutos para apresentar seu trabalho em seção pública.

§ 3º. A avaliação da defesa de dissertação verificará os mesmos critérios constantes no **Art. 42º**, com exceção do item VII.

Art. 57º. A Comissão Examinadora indicará a aprovação ou não da dissertação baseando-se na avaliação do trabalho entregue e na sua apresentação pública, atribuindo ao candidato uma das seguintes menções: aprovado ou reprovado.

§ 1º. Foi considerado aprovado ou reprovado o aluno que receber esta menção pela maioria dos membros da comissão julgadora;

§ 2º. O aluno que recebeu a menção reprovado é cancelado de imediato do programa;

§ 3º. No caso de modificação sugerida na dissertação ou na tese, a ocorrência é registrada na ata de defesa e o aluno deve efetuar a modificação dentro do prazo máximo de 90 (noventa) dias para reapresentação do referido trabalho, através de parecer fundamentado.

§ 4º. Após a aprovação final o aluno entregará à Secretaria do Programa um exemplar da dissertação em meio digital (CD ROM), no formato word e pdf, que deverá estar de acordo com as normas vigentes para apresentação de dissertações.

ANEXO G – PADRÃO DE CITAÇÃO DA AFILIAÇÃO INSTITUCIONAL.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

RESOLUÇÃO Nº 12/CEPE, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018.

Estabelece padrão para afiliação institucional da Universidade Federal do Ceará em todas as publicações científicas nacionais e internacionais.

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, e, tendo em vista o que deliberou o Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão (CEPE), em sua reunião de **26 de novembro de 2018**, na forma do que dispõe o inciso V do art. 53 da Lei nº 9.394, de 20 de dezembro de 1996, e as competências previstas nos artigos 11, letra *a*, e 25, letra *s*, do Estatuto em vigor, e considerando:

- a) a necessidade de estabelecer uma forma padronizada para a afiliação institucional da Universidade Federal do Ceará em publicações científicas nacionais e internacionais;
- b) a importância da padronização da afiliação para o rastreamento e coleta das informações que compõem os indicadores de vários *rankings* e estatísticas,

RESOLVE:

Art. 1º O padrão para afiliação institucional da Universidade Federal do Ceará em todas as publicações científicas nacionais e internacionais deve seguir os seguintes critérios:

I - em todas as publicações (artigos, livros, capítulos de livros, etc), nacionais e internacionais, a afiliação institucional deverá obedecer o seguinte formato: Departamento (nome do departamento), Unidade Acadêmica (Centro, Faculdade, Campus, Instituto), Universidade Federal do Ceará, Cidade - CE, CEP 00000-000, Brasil.

II - em casos excepcionais, havendo obrigatoriedade da afiliação institucional em inglês por parte da Editora ou entidade congênere, deverá ser obedecido o seguinte formato: Department (department name), Academic Unit (Center, Faculty, Institute, Campus), Federal University of Ceara, Cidade – CE, Zip Code 00000-000, Brazil.

§ 1º No caso de inclusão do nome de núcleo, laboratório ou congêneres na afiliação, este deve ser inserido antes do nome do Departamento.

§ 2º Na ausência de Departamento, este será substituído nome do curso (School para afiliação em Inglês) seguido pelo nome da Unidade Acadêmica (*Campus*, Instituto).

Art. 2º A comunidade acadêmica da UFC deverá utilizar os nomes oficiais das estruturas departamentais e acadêmicas constantes no anexo do Estatuto da Universidade Federal do Ceará.

Art. 3º Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Reitoria da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, 26 de novembro de 2018.

Prof. **Henry de Holanda Campos**
Reitor

**ANEXO H – PARECER DE CONFORMIDADE DA LÍNGUA PORTUGUESA DA
VERSÃO FINAL PARA DEFESA DA DISSERTAÇÃO.**

DECLARAÇÃO

Eu, Crerlânio Muniz Moreira, graduado em Letras/Português CPF 589399623-20, declaro, para os devidos fins e para fazer prova junto à Coordenação do Departamento de Medicina – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará- Campus Sobral - que realizei a revisão de português do trabalho intitulado “ ANÁLISE *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE BIOCAMPÓSITOS DE GELATINA E HIDROXIAPATITA DE TILÁPIA DO NILO (*oreochromis niloticus*)”, de autoria de Efigênia Maria de Sousa, consistindo em correção gramatical, correção dos aspectos linguísticos e da inteligibilidade do texto.

Por ser verdade, firmo a presente,

Sobral, 23 de abril de 2020



Crerlânio Muniz Moreira

CPF 589399623-20

Graduado em Letras Plena
Registro 348; Livro GS-06; Folha 174

Pós-Graduado em Língua Portuguesa e Literatura
Registro 16655; Livro ESP- 03; Folha 5552