



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

LORENA ALVES LEITE

**HIDROGÉIS DE GELATINA DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADOS
COM HIDROXIAPATITA E κ -CARRAGENANA: UM NOVO MATERIAL PARA
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

FORTALEZA

2021

LORENA ALVES LEITE

HIDROGÉIS DE GELATINA DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADOS COM
HIDROXIAPATITA E κ -CARRAGENANA: UM NOVO MATERIAL PARA APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS

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

Orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho.

FORTALEZA

2021

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)

L554h Leite, Lorena Alves.

Hidrogéis de gelatina de tilápia (*Oreochromis niloticus*) associados com hidroxapatita e k-carragenana: um novo material para aplicações biotecnológicas / Lorena Alves Leite. – 2021.
120 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Coorientação: Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho.

1. Aproveitamento de resíduos. 2. Biomateriais. 3. Regeneração óssea. I. Título.

CDD 639.2

LORENA ALVES LEITE

HIDROGÉIS DE GELATINA DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADOS COM
HIDROXIAPATITA E κ -CARRAGENANA: UM NOVO MATERIAL PARA APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS

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

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho (Coorientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dr. Adriano Lincoln Albuquerque Mattos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dra. Juliana Rabelo de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, José Luís e Antônia Lúcia.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza, pela excelente orientação. Por sempre ter acreditado em mim, por ter me apoiado desde o começo quando aceitou minha orientação no finalzinho do mestrado e quando passei na seleção de doutorado. Obrigada por todos os conselhos, por ter um coração grandioso e por ser tão humano. Com certeza levarei o senhor como exemplo por onde eu for. Obrigada por tanto!

Ao Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho, pela excelente orientação, pelos incontáveis conselhos, por sempre ter demonstrado um carinho e amor gigantesco, pelos cartões também (porque faz parte, e são com eles que nós amadurecemos), pelos inúmeros artigos enviados por e-mail, por ser esse professor tão humano, amado e respeitado, o qual tenho um orgulho gigantesco. Além disso, quero agradecer por todos os momentos em que eu fui na sua salinha chorar, ou dizer que as coisas não iam bem, e o senhor sempre me acolheu prontamente. Não esquecerei disso jamais. Fui agraciada por Deus, por ter conhecido uma pessoa tão boa e de coração generoso. Muito obrigada!

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Adriano, Prof. Dr. André, Profa. Dra. Fábيا e Dra. Juliana pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca (PPGEP), em nome do coordenador e professor Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza.

Ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio financeiro ao projeto “Estruturação de ações e inovação para o fortalecimento de cadeias produtivas da aquicultura no Brasil” (BRS-Aqua).

Ao projeto “Aplicação Biotecnológica de Moléculas Naturais” do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A Deus, pela sua infinita bondade e misericórdia, que mesmo nos dias mais difíceis sempre me mostrou de algum jeito que tudo ia ficar bem (e realmente ficou).

Aos meus pais, José Luis e Antônia Lúcia, por todo amor, dedicação e paciência. Essa conquista é nossa.

A toda minha família Buscapé, em especial ao meu irmão José Luis Alves Leite, pelos momentos de descontração, amor e sorrisos.

Ao meu esposo, Luis Átila, por todo apoio, paciência e amor, pois mesmo nas horas em que eu achava que iria fraquejar, ele sempre me levantava e estava ali presente para me apoiar e aconselhar em todas as minhas decisões e aflições. Te amo!

A todos os meus amigos do Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE) e do Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB) – EMBRAPA. Não vou citar nomes porque posso cometer o erro de esquecer alguém.

A todas as minhas amigas mais que especiais (sereias), Alynne Silva, Andressa Pâmela, Fabrícia Quaresma, Juliana Fernandes, Vanessa Feitosa e Vanessa Pereira, que estiveram presentes nessa árdua e ao mesmo tempo divertida caminhada. Vocês são maravilhosas.

Em especial, a minha amiga Vanessa de Abreu Pereira, por toda ajuda nos momentos em que mais precisei. Quando achava que iria desanimar e fraquejar, sempre esteve ao meu lado, dizendo que tudo iria ficar bem e que no final daria certo. Meu muito obrigada, amiga. Você é um anjo de luz.

Ao Joan Petrus, que sempre se mostrou solícito quando eu queria tirar milhões de dúvidas com ele, e com toda paciência do mundo sempre me ajudava.

Ao Adriano Mattos, analista da Embrapa, por toda atenção, disponibilidade, e por todos os momentos de descontração.

“É justo que muito custe o que muito vale.”
(Santa Teresa D’Ávila)

RESUMO

Com a expansão da atividade da aquicultura, grandes quantidades de resíduos de pescado são desperdiçados, gerando impacto ambiental indesejável. Diante disso, novas alternativas vem surgindo visando a reutilização dessa matéria-prima na obtenção de biomoléculas com potencial biotecnológico, como a gelatina e hidroxiapatita, que são muito usadas na área de engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Além dos resíduos de pescado, algas vermelhas também são fonte de biomoléculas com grande potencial de aplicação em engenharia de tecidos, tais como os polissacarídeos sulfatados. Portanto, o objetivo do trabalho foi desenvolver hidrogéis a base de gelatina e hidroxiapatita extraídos a partir de resíduos de pele de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), associados com κ -carragenana, oriunda da alga *Hypnea musciformis*, e reticulados com riboflavina e curcumina visando aplicação como ósseo-reconstrutor. A gelatina foi caracterizada por meio de rendimento, análise eletroforética, força de gel, ponto isoelétrico, FTIR e TGA. Já a hidroxiapatita e κ -carragenana foram caracterizadas quanto ao FTIR, TGA, MEV-EDS, DR-X e RMN. Foram elaboradas cinco formulações de hidrogéis: GC; GCH; GCH_{Rib}; GCH_{RibUV} e GCH_{Curc}, as quais foram preparadas com gelatina, carragenana, hidroxiapatita e reticulantes. Os hidrogéis foram caracterizados por meio de FTIR, TGA, DR-X, MEV, MEV-EDS, grau de intumescimento, grau de reticulação e citotoxicidade com fibroblastos e osteoblastos. A gelatina apresentou elevado peso molecular e uma alta força gel (277 ± 20 g). A hidroxiapatita e κ -carragenana foram identificadas por meio de DR-X e RMN, respectivamente. Sobre os hidrogéis, o FTIR identificou principais grupos e ligações dos compostos presentes na matriz. No TGA, foi possível confirmar que a adição da hidroxiapatita aumentou a estabilidade térmica. No MEV foi identificado que os hidrogéis são porosos. O MEV-EDS identificou os elementos químicos que fazem parte da composição das biomoléculas utilizadas. Os hidrogéis apresentaram um ótimo grau de intumescimento. No grau de reticulação confirmou-se que a hidroxiapatita atuou como reticulante, e que a riboflavina e curcumina também apresentaram bons resultados, com maior destaque para o hidrogel que continha curcumina (GCH_{Curc}). Por fim, todos os hidrogéis apresentaram viabilidade celular (>100%) em células de fibroblastos e osteoblastos. Deste modo, foi possível concluir que os hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina possuem um grande potencial para serem usados na área de reconstrução óssea, com destaque maior para o GCH_{Curc}.

Palavras-chave: aproveitamento de resíduos; biomateriais; regeneração óssea.

ABSTRACT

With the expansion of aquaculture activity, large amounts of fish waste are wasted, generating an undesirable environmental impact. Therefore, new alternatives have emerged aiming at the reuse of this raw material to obtain biomolecules with biotechnological potential, such as gelatin and hydroxyapatite, which are widely used in the area of tissue engineering and regenerative medicine. In addition to fish waste, red algae are also a source of biomolecules with great potential for application in tissue engineering, such as sulfated polysaccharides. Therefore, the objective of this work was to develop hydrogels based on gelatin and hydroxyapatite extracted from Nile tilapia (*O. niloticus*) skin residues, associated with κ -carrageenan, derived from the algae *Hypnea musciformis*, and crosslinked with riboflavin and curcumina aiming at application as a bone-reconstructor. Gelatin was characterized by yield, electrophoretic analysis, gel strength, isoelectric point, FTIR and TGA. On the other hand, hydroxyapatite and κ -carrageenan were characterized in terms of FTIR, TGA, SEM-EDS, DR-X and NMR. Five hydrogel formulations were developed: GC; GCH; GCH_{Rib}; GCH_{RibUV} and GCH_{Curc}, which were prepared with gelatin, carrageenan, hydroxyapatite and crosslinkers. The hydrogels were characterized by means of FTIR, TGA, DR-X, SEM, SEM-EDS, degree of swelling, degree of cross-linking and cytotoxicity with fibroblasts and osteoblasts. Gelatin had a high molecular weight and a high gel strength (277 ± 20 g). Hydroxyapatite and κ -carrageenan were identified by DR-X and NMR, respectively. On the hydrogels, the FTIR identified the main groups and bonds of the compounds present in the matrix. In TGA, it was possible to confirm that the addition of hydroxyapatite increased the thermal stability. In the SEM it was identified that the hydrogels are porous. The MEV-EDS identified the chemical elements that are part of the composition of the biomolecules used. The hydrogels showed an excellent degree of swelling. In terms of crosslinking, it was confirmed that hydroxyapatite acted as a crosslinker, and that riboflavin and curcumin also showed good results, with greater emphasis on the hydrogel containing curcumin (GCH_{Curc}). Finally, all hydrogels showed cell viability (>100%) in fibroblast and osteoblast cells. Thus, it was possible to conclude that the hydrogels of gelatin, hydroxyapatite and κ -carrageenan cross-linked with riboflavin and curcumin have great potential to be used in the area of bone reconstruction, with greater emphasis on GCH_{Curc}.

Keywords: waste recovery; biomaterials; bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura química básica da gelatina	24
Figura 2	– Composição de aminoácidos da gelatina	25
Figura 3	– Estrutura da hidroxiapatita	28
Figura 4	– Estrutura química das carragenanas Kappa (κ), Iota (ι) e Lambda (λ).....	31
Figura 5	– Desenho esquemático da estrutura interna do osso contendo ossos esponjosos, corticais, fibras de colágeno, fibras mineralizadas e hidroxiapatita	33
Figura 6	– Estrutura química da riboflavina	38
Figura 7	– Reação de reticulação de radical livre foto-iniciada induzida por riboflavina	39
Figura 8	– Estrutura química da curcumina	40
Figura 9	– Fluxograma da extração da gelatina oriunda da pele de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	43
Figura 10	– Fluxograma da extração de hidroxiapatita oriunda das escamas de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	44
Figura 11	– Fluxograma da extração de κ -carragenana da alga vermelha (<i>H. musciformis</i>)	45
Figura 12	– Fluxograma dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	47
Figura 13	– Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da gelatina extraída da pele de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	55
Figura 14	– MEV/EDS da hidroxiapatita extraída da escama de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	66
Figura 15	– MEV/EDS da κ -carragenana extraída da alga vermelha (<i>H. musciformis</i>) ..	71
Figura 16	– Hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina: GC; GCH; GCH _{Rib} ; GCH _{RibUV} e GCH _{Curc}	72

Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	81
Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Ponto isoelétrico (pI) da gelatina extraída da pele de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	58
Gráfico 2 – Bandas de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da gelatina extraída da pele de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	59
Gráfico 3 – Curva termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG) da gelatina extraída da pele de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	61
Gráfico 4 – Bandas de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da hidroxiapatita extraída da escama de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	62
Gráfico 5 – Curva termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG) da hidroxiapatita extraída da escama de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	63
Gráfico 6 – Difratoograma da hidroxiapatita extraída da escama de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) (A) e da sua correspondente ficha cristalográfica (ICDD 01-086-1199 (B))	64
Gráfico 7 – Bandas de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da κ -carragenana extraída da alga vermelha (<i>H. musciformis</i>)	67
Gráfico 8 – Curva termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG) da κ -carragenana extraída da alga vermelha (<i>H. musciformis</i>)	68
Gráfico 9 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H da κ -carragenana extraída da alga vermelha (<i>H. musciformis</i>)	69
Gráfico 10 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C da κ -carragenana extraída da alga vermelha (<i>H. musciformis</i>)	70
Gráfico 11 – Bandas de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	73

Gráfico 12 – Curva termogravimétrica (TGA) (A) e sua derivada (DTG) (B) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	75
Gráfico 13 – Derivada (DTG) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	77
Gráfico 14 – Difratoograma dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	79
Gráfico 15 – Grau de intumescimento - GI (%) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina ...	85
Gráfico 16 – Grau de reticulação - GR (%) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	88
Gráfico 17 – Viabilidade celular (%) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina em células de fibroblastos (L929) em 24 e 48 h	90
Gráfico 18 – Viabilidade celular (%) dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina em células de osteoblastos (MC3T3) em 24 e 48 h	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais fosfatos de cálcio (CaP)	28
Tabela 2 – Formulações dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	46
Tabela 3 – Principais eventos e suas respectivas temperaturas de degradação (T_{PICO} e T_{ONSET}), perdas de massa (Δm) e resíduos da análise de TGA dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita e κ -carragenana reticulados com riboflavina e curcumina	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	Gelatina	24
3.2	Hidroxiapatita	27
3.3	Carragenana	30
3.4	Engenharia de tecidos	32
3.5	Hidrogéis	34
3.5.1	<i>Hidrogéis ósseos</i>	35
3.6	Reticulantes (agentes <i>crosslinking</i>)	36
3.6.1	<i>Riboflavina</i>	37
3.6.2	<i>Curcumina</i>	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Obtenção e preparo da matéria-prima	41
4.2	Extração da gelatina	42
4.3	Obtenção da hidroxiapatita	43
4.4	Obtenção da κ-carragenana	44
4.5	Desenvolvimento dos hidrogéis de gelatina, hidroxiapatita, κ-carragenana com riboflavina e curcumina	45
4.6	Caracterização da gelatina, hidroxiapatita, κ-carragenana e hidrogéis	47
4.6.1	<i>Rendimento da extração da gelatina</i>	47
4.6.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	48
4.6.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	48
4.6.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)</i>	48
4.6.5	<i>Ponto isoelétrico (pI)</i>	49
4.6.6	<i>Força de gel</i>	49
4.6.7	<i>Análise eletroforética</i>	49

4.6.8	<i>Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (RMN)</i>	50
4.6.9	<i>Difração de Raios-X (DR-X)</i>	50
4.6.10	<i>Grau de intumescimento (GI)</i>	50
4.6.11	<i>Grau de reticulação (GR)</i>	51
4.6.12	<i>Análise de Citotoxicidade com fibroblastos (L929) e osteoblastos (MC3T3)</i> ...	51
4.6.13	<i>Análise estatística</i>	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Gelatina	54
5.1.1	<i>Rendimento da extração</i>	54
5.1.2	<i>Análise eletroforética</i>	55
5.1.3	<i>Força de gel</i>	56
5.1.4	<i>Ponto isoelétrico (pI)</i>	57
5.1.5	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	59
5.1.6	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	60
5.2	Hidroxiapatita	62
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	62
5.2.2	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	63
5.2.3	<i>Difração de Raios-X (DR-X)</i>	64
5.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)</i>	65
5.3	κ-carragenana	66
5.3.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	66
5.3.2	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	67
5.3.3	<i>Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (RMN)</i>	68
5.3.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)</i>	71
5.4	Hidrogéis	71
5.4.1	<i>Caracterização dos hidrogéis</i>	72
5.4.1.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier</i>	72

5.4.1.2	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	75
5.4.1.3	<i>Difração de Raios-X (DR-X)</i>	78
5.4.1.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	80
5.4.1.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)</i>	82
5.4.1.6	<i>Grau de intumescimento (GI)</i>	85
5.4.1.7	<i>Grau de reticulação (GR)</i>	87
5.4.1.7	<i>Análise de Citotoxicidade com fibroblastos (L929) e osteoblastos (MC3T3)</i>	89
6	CONCLUSÃO	93
7	PROPOSTAS FUTURAS	94
	REFERÊNCIAS	95