



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LETÍCIA SALES DE FREITAS FERNANDES

**FORMULAÇÃO DE UM NOVO AEROGEL À BASE DE CELULOSE BACTERIANA
FUNCIONALIZADO COM PROTEÍNAS DO HUMOR VÍTREO DE ATUM (*Thunnus
albacares*)**

FORTALEZA

2023

LETÍCIA SALES DE FREITAS FERNANDES

FORMULAÇÃO DE UM NOVO AEROGEL À BASE DE CELULOSE BACTERIANA
FUNCIONALIZADO COM PROTEÍNAS DO HUMOR VÍTREO DE ATUM (*Thunnus
albacares*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Coorientadora: Fábiana Karine Andrade.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F399f Fernandes, Letícia Sales de Freitas.
 Formulação de um novo aerogel à base de celulose bacteriana funcionalizado com proteínas do humor vítreo de atum (*Thunnus albacares*) / Letícia Sales de Freitas Fernandes. – 2023.
 58 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.
 Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
 Coorientação: Profa. Dra. Fábiana Karine Andrade.
1. Aerogel. 2. Humor vítreo. 3. Atum. I. Título.

CDD 661

LETÍCIA SALES DE FREITAS FERNANDES

FORMULAÇÃO DE UM NOVO AEROGEL À BASE DE CELULOSE BACTERIANA
FUNCIONALIZADO COM PROTEÍNAS DO HUMOR VÍTREO DE ATUM (*Thunnus
albacares*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da
Silva.

Aprovada em: 11/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr^a. Talita Abrante Leite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Fábio Pereira de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, Emília.

À minha avó, Agamenilza.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), pelo apoio estrutural e financeiro que contribuíram para minha permanência no curso.

Ao Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva, por ter sido paciente, empático e humano nos momentos difíceis.

À Dra. Fábiana Karine da empresa Biohealing, que me acolheu no ambiente laboratorial da empresa e me ajudou muito no início do processo da minha monografia.

Ao MSc. Wallady Barroso, por ter contribuído imensamente com seus conhecimentos na realização deste trabalho.

Aos participantes da banca examinadora, Talita Abrante e Fábio Souza, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao meu colega de curso e grande amigo, Edu Sombra, por ter sido uma inspiração para mim durante a produção deste trabalho, por ter me ajudado diversas vezes e por tirar todas as minhas dúvidas sempre com muita empatia e atenção.

À minha família, por ser meu porto seguro e meu apoio durante todo o processo. À minha mãe, Emília, a pessoa mais importante da minha vida, por ter investido em mim, por ter me incentivado o tempo todo, por me levantar e me acolher quando eu pensava em desistir. À minha avó, Agamenilza, por ter me impulsionado a seguir em frente e por me oferecer aconchego nas horas desafiadoras. Ao meu avô, Roberto, por estar sempre presente demonstrando amor e por ter me dado um notebook que, sem ele, não teria sido possível continuar o meu curso. Ao meu tio, Marco, por ouvir minhas histórias e por ter me dado teclado e mouse para facilitar meus estudos online na época da pandemia. Ao meu irmão, Vinícius, por ter me escutado e por ter me dado sábios conselhos que levarei para toda a vida. À minha tia, Mayra, por sempre me dar dicas de estudos e do mercado de trabalho. Ao meu tio, Rodrigo, por ser um exemplo de disciplina para mim e por me incentivar a seguir bons caminhos na vida.

RESUMO

Os biomateriais são materiais que desempenham interações complexas com sistemas vivos e são aplicados principalmente na regeneração tecidual, demandando facilidade de fabricação, biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas. A bioprospecção no ambiente marinho, rico em compostos bioativos, oferece oportunidades na produção de biomateriais para medicina regenerativa. O humor vítreo (HV), uma substância gelatinosa que compõe aproximadamente 80% do globo ocular e é encontrada em abundâncias nos peixes, possui moléculas valiosas que podem ser incorporadas aos biomateriais. Apesar de desempenhar papéis biomecânicos, óticos e bioquímicos, a complexidade de sua composição e função em peixes demanda mais estudos. Além disso, aumento do consumo de peixes gera resíduos prejudiciais ao ambiente marinho, destacando a necessidade de reutilização e gestão sustentável dos resíduos da indústria pesqueira. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo formular um aerogel à base de celulose bacteriana funcionalizado com HV de atum (*Thunnus albacares*) e realizar uma caracterização físico-química e biológica parcial deste biomaterial. Os olhos de atum foram coletados em uma indústria de processamento, passando por protocolos sanitários, e o HV foi extraído após pré-processamento. A extração de proteínas do HV foi realizada em duas soluções, seguida por análise eletroforética. Membranas de celulose bacteriana (CB) foram produzidas, e matrizes híbridas foram formuladas com CB e alginato de sódio em diferentes concentrações, reticuladas com CaCl_2 . Proteínas do HV foram incorporadas às blendas. As matrizes foram analisadas quanto à morfologia, porosidade e citotoxicidade. A porcentagem de células viáveis após o contato com as matrizes foi avaliada e os resultados, estatisticamente analisados. Análises das frações proteicas solúveis e citotoxicidade indicaram similaridade entre as amostras de humor vítreo (HV) e humor aquoso mais humor vítreo (HVA). A adição de proteínas do HV às blendas não interferiu nas propriedades físicas do material. Análise de espectroscopia de infravermelho mostrou que os componentes das blendas não interagiram quimicamente e a avaliação de microscopia eletrônica revelou que a adição do HV aumentou o número de poros superficiais das matrizes. Por fim, o teste de citotoxicidade revelou que as formulações não eram tóxicas, sugerindo o potencial promissor do material para futuras pesquisas em terapias avançadas de regeneração epitelial, destacando a necessidade de avaliações adicionais com diferentes linhagens celulares e modelos animais.

Palavras-chave: Aerogel; Humor vítreo; Atum.

ABSTRACT

Biomaterials are materials that perform complex interactions with living systems and are mainly applied in tissue regeneration, requiring ease of manufacture, biocompatibility and adequate mechanical properties. Bioprospecting in the marine environment, which is rich in bioactive compounds, offers opportunities for the production of biomaterials for regenerative medicine. Vitreous humor (VH), a gelatinous substance that makes up approximately 80% of the eyeball and is found in abundance in fish, has valuable molecules that can be incorporated into biomaterials. Although it plays biomechanical, optical and biochemical roles, the complexity of its composition and function in fish requires further study. In addition, increased fish consumption generates waste that is harmful to the marine environment, highlighting the need for reuse and sustainable management of waste from the fishing industry. In this context, the aim of this study was to formulate an aerogel based on bacterial cellulose functionalized with tuna (*Thunnus albacares*) VH and to carry out a partial physicochemical and biological characterization of this biomaterial. The tuna eyes were collected in a processing industry, undergoing sanitary protocols, and the VH was extracted after pre-processing. Protein extraction from VH was carried out in two solutions, followed by electrophoretic analysis. Bacterial cellulose (BC) membranes were produced, and hybrid matrices were formulated with BC and sodium alginate at different concentrations, cross-linked with CaCl_2 . VH proteins were incorporated into the blends. The matrices were analyzed for morphology, porosity and cytotoxicity. The percentage of viable cells after contact with the matrices was evaluated and the results statistically analyzed. Analysis of the soluble protein fractions and cytotoxicity indicated similarity between the vitreous humor (VH) and aqueous humor plus vitreous humor (AHT) samples. The addition of VH proteins to the blends did not interfere with the material's physical properties. Infrared spectroscopy showed that the components of the blends did not interact chemically and electron microscopy revealed that the addition of VH increased the number of surface pores in the matrices. Finally, the cytotoxicity test revealed that the formulations were not toxic, suggesting the promising potential of the material for future research into advanced therapies for epithelial regeneration, highlighting the need for further evaluations with different cell lines and animal models.

Keywords: Aerogel; Vitreous humor; Tuna.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura básica do globo ocular humano.....	28
Figura 2	– Morfologia comparada dos globos oculares de tilápia e de atum	38
Figura 3	– Conteúdo interno do globo ocular de atum congelado e após descongelamento parcial.....	39
Figura 4	– Extração do humor vítreo aquoso de atum	40
Figura 5	– SDS-PAGE (12,5%) das proteínas do HV de atum.....	41
Figura 6	– Citotoxicidade do HV e HVA de atum contra fibroblastos de camundongo (L-929).....	42
Figura 7	– Aerogéis de humor vítreo, alginato e celulose bacteriana.....	44
Figura 8	– Matrizes de CB-AL-HV e CB-AL.....	45
Figura 9	– Gráfico de FTIR das amostras de CB-AL produzidas pelas metodologias M1 e M2.....	46
Figura 10	– Porosidade das matrizes de CB-AL2.....	47
Figura 11	– Micrografias eletrônicas de varredura da superfície e da fratura lateral dos diferentes aerogéis formulados.....	48
Figura 12	– Citotoxicidade indireta contra fibroblastos de camundongo (L-929) <i>in vitro</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Biomateriais categorizados quanto à composição química e as suas aplicações.....	19
Tabela 2	– Biomateriais utilizados em aplicações médicas diversas.....	20
Tabela 3	– Blendas de celulose bacteriana, alginato e proteínas do humor vítreo.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CT	Células tronco
ex.	Exemplo
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
UV	Ultravioleta
CE	Estado do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
HV	Humor vítreo
Haq	Humor aquoso
HVA	Humor vítreo e humor aquoso
CB	Celulose bacteriana
HS	Hestrin e Schramm
AL	Alginato de sódio
CMC	Carboximetilcelulose
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
SDS	Dodecilsulfato de sódio
L-929	Fibroblastos de camundongo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M1	Primeira metodologia
M2	Segunda metodologia
Finep	Financiadora de Estudos e Projetos
CAPES	Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMEN	<i>Modified Eagle Medium</i>
FBS	Sérum de feto bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos

MA

Estado de Massachusetts

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E FÓRMULAS

NaCl	Cloreto de sódio
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
H ₂ O	Água
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono ou gás carbônico
O-H	Hidroxila
C=O	Carbonila
C-O	
TRIS-HCl	Cloridrato de trometamina ou Tris(hidroximetil)-aminometano
®	Marca Registrada
p	Peso
v	Volume
ph	Potencial hidrogeniônico
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
L	Litro
g	grama
mg	Miligrama
mol	Quantidade de substância ou 6,02 vezes 10 ²³ unidades
µmHg	Micrômetro de mercúrio
µm	Micrômetro
Km	Quilômetro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
mA	Miliampere
V	Volt
°C	Grau Celsius
rpm	Rotação por minuto
%	Por cento
h	Hora

min	Minuto
:	Proporcional à
<	Menor que
-	Menos
P	Valor-p ou probabilidade
n	Espaço amostral
x	Veze
β	Beta
α	Alfa
γ	Lambda ou comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Medicina regenerativa.....	14
1.2 Biomateriais: conceitos, tipos e características	15
1.3 Aplicações de biomateriais na medicina regenerativa.....	18
1.3.1 Hidrogéis e aerogéis como biomateriais aplicados na medicina regenerativa	21
1.4 Aproveitamento do resíduo da indústria pesqueira para obtenção do humor vítreo	24
1.5 Organismos marinhos como fontes alternativas para prospecção de novos bioativos	26
1.6 Características morfológicas e moleculares gerais do humor vítreo	27
1.6.1 Humor vítreo de peixes	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Aspectos éticos e legais do uso do atum (<i>Thunnus albacares</i>).....	31
3.2 Coleta dos olhos de atum (<i>T. albacares</i>)	32
3.3 Processamento do humor vítreo (HV) de atum.....	32
3.4 Extração de proteínas do HV de atum (<i>T. albacares</i>)	32
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).....	33
3.6 Produção de Celulose Bacteriana (CB).....	33
3.7 Produção de aerogel de celulose bacteriana com alginato de sódio e HV	34
3.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	35
3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.10 Análise da porosidade.....	36
3.11 Avaliação da citotoxicidade	36
3.12 Análises estatísticas.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 Coleta e extração do HV de atum.....	38
4.2 Extrato proteico e SDS-PAGE	40
Fonte: elaborado pela autora.....	42
4.3 Preparo do aerogel de CB-AL com e sem HV	42
4.4 Avaliação de FTIR	45

4.5 Porosidade do biomaterial	47
4.6 Análise de MEV	48
4.7 Citotoxicidade do biomaterial	49
5 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Medicina regenerativa

A vertente da medicina regenerativa exerce um papel pioneiro na área da saúde, oferecendo soluções tecnológicas e inovadoras para muitas doenças incuráveis da atualidade. O principal objetivo da medicina regenerativa é a regeneração e restauração dos tecidos e órgãos doentes ou danificados através da combinação de princípios da biologia celular básica com estratégias de engenharia (Dzobo *et al.*, 2018; Terzic *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2021).

Os avanços da tecnologia nas áreas da ciência dos materiais, biologia celular, nanomedicina e engenharia de tecidos têm possibilitado a criação de um ecossistema ‘biopotencializado’ no campo da medicina regenerativa que permitem tratamentos de doenças mais especializados e novas estratégias de restauração de tecidos e órgãos. Essa área da medicina tem evoluído e se transformado em uma indústria ao longo das últimas décadas com sua crescente disponibilidade de terapias (Yu *et al.*, 2021).

Desde o seu princípio até os dias atuais, o foco elementar da medicina regenerativa se baseia no uso de células tronco (CT) como terapias de regeneração e reconstrução de tecidos e órgãos. Muitos ensaios clínicos e tratamentos dessa área, realizados por médicos e pesquisadores ao redor do mundo, utilizam as CT como tratamento (WYLES *et al.*, 2021). Elas são definidas como células primordiais e indiferenciadas do organismo que possuem a capacidade de dar origem à diversas células que constituem o corpo humano (Birbrair; Frenette, 2016; Wyles *et al.*, 2021).

No entanto, há uma extensa gama de novas terapias regenerativas surgindo, não somente aquelas baseadas em CT, mas também em abordagens da engenharia de tecidos e da reparação molecular. O termo ‘medicina regenerativa’ muitas vezes é entendido como sinônimo de engenharia de tecidos e, apesar do senso comum frequentemente implicar que a medicina regenerativa utiliza somente a CT como terapia, ela é mais diversificada que isto. Tanto é que a engenharia de tecidos é uma área que pode ser incluída dentro da medicina regenerativa, pois seu princípio básico é ter a capacidade de oferecer a reconstituição ou regeneração da função de um tecido vivo através de produtos terapêuticos em uma escala clínica, podendo ou não se utilizar de células vivas para essa finalidade (Berthiaume; Maguire; Yarmush, 2011; Wyles *et al.*, 2021).

Na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de materiais é um campo emergente e de grande importância para os avanços nos tratamentos da medicina regenerativa, pois os

materiais fabricados são usados de forma extensa como processos terapêuticos da restauração de tecidos e incluem novas terapias como os arcabouços (do inglês, '*scaffolds*') de tecidos, sistemas de administração de medicamentos (do inglês, '*drug delivery*'), substitutos de tecidos descelularizados e muitos outros. A fabricação e o design de materiais com propriedades físico-químicas otimizadas, estruturas melhoradas e boa biocompatibilidade são as características principais dessa área da engenharia de tecidos (Yu *et al.*, 2021).

Além disso, uma grande variedade de técnicas de biotecnologia têm sido exploradas no desenvolvimento de materiais para a medicina regenerativa e algumas delas abordam a engenharia genética, o encapsulamento de células revestidas por polímeros ou nanopartículas, produção de *scaffolds* ou filmes imersos em células e impressão tridimensional de tecidos e órgãos. A partir disso, os materiais desenvolvidos para interagir com sistemas vivos foram denominados de biomateriais (Das; Baker, 2016; Yu *et al.*, 2021).

1.2 Biomateriais: conceitos, tipos e características

Em 1973, a Diretoria de Consultoria em Biomateriais da Universidade de Clemson definiu um dos primeiros conceitos de biomateriais, a pedido da Organização Mundial da Saúde. Foi definido que os biomateriais eram substâncias sistematicamente e farmacologicamente inertes designadas para implantação ou incorporação em sistemas vivos (Parida; Behera; Mishra, 2012). Em 1987, a Sociedade Europeia de Biomateriais, na Conferência sobre Consenso nas Definições em Ciências de Biomateriais, debateu mais sobre o tema e chegou a um conceito parecido de biomateriais. Foi determinado que biomaterial era um material não viável usado em dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos (Parida; Behera; Mishra, 2012; Williams, 2009).

O assunto foi deliberado em uma conferência posterior e o termo “não viável” foi retirado da definição. Em 1999, foi publicado um dicionário contextual sobre ciência dos biomateriais no qual o autor conceituava biomaterial como um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Com o passar do tempo, as definições foram se tornando mais complexas e robustas, os biomateriais foram conceituados como materiais de origem natural ou sintética em contato com tecidos, sangue e fluidos biológicos, e projetados para o uso em aplicações protéticas, terapêuticas, diagnósticas e de armazenagem sem afetar negativamente o organismo vivo e seus componentes (Parida; Behera; Mishra, 2012; Williams, 2009).

Porém, a definição considerada mais completa neste trabalho é a que biomaterial é

uma substância engenheirada para tomar uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária (Williams, 2009).

Atualmente, o papel dos biomateriais tem sido fortemente influenciado pelos avanços nas áreas da biotecnologia e eles são utilizados para produzir dispositivos que substituem uma parte ou função do organismo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente satisfatória (Parida; Behera; Mishra, 2012).

No entanto, para serem usados em tratamentos e terapias da medicina, os biomateriais precisam atender alguns requisitos e possuir propriedades importantes, as quais os tornem aptos a serem implantados no organismo. O primeiro requisito é que os biomateriais devem ser facilmente fabricados, purificados e esterilizáveis por métodos conhecidos e convencionais (Bernardo *et al.*, 2021), para que não sejam veículos transportadores de microrganismos e substâncias contaminantes ao corpo (Bhatia, 2010). O segundo requisito deve ser a biocompatibilidade do material, que se caracteriza pela habilidade de interagir com o sistema biológico de forma harmoniosa e compatível, sem gerar danos ou respostas negativas no organismo, como inflamações, irritações, necroses ou alergias (Bernardo *et al.*, 2021; Bhatia, 2010; Patel; Gohil, 2012).

Outros fatores importantes que os biomateriais devem apresentar, e que estão bastante interligados, é a biofuncionalidade e a indução de resposta do hospedeiro, ou seja, é a capacidade do biomaterial de desempenhar uma função específica no tecido que foi implantando, por exemplo, administração de medicamentos (ex. nanovesículas), aceleração da regeneração tecidual (ex. hidrogéis) e controle do fluxo sanguíneo (ex. coração artificial), e essa função desempenhada precisa gerar uma resposta fisiológica no tecido que recebeu o biomaterial (Patel; Gohil, 2012; Williams, 2009).

Além disso, uma das propriedades fundamentais que os biomateriais devem possuir é a de não ser tóxico para o organismo, isto é, não podem liberar produtos de reações ou resíduos que causem hemólise, inflamação ou citotoxicidade, em outras palavras, não devem causar mais prejuízos e efeitos colaterais do que benefícios no corpo. Por último, as estruturas dos biomateriais devem ter propriedades mecânicas compatíveis com os tecidos nos quais serão implantados, como resistência à tensão, à compressão e ao cisalhamento, nível de corrosão e elasticidade (Bernardo *et al.*, 2021; Bhatia, 2010; Patel; Gohil, 2012; Ducheyne *et al.*, 2011).

Dito isso, a classificação dos biomateriais pode variar dependendo do contexto

histórico e dos critérios de interesse do pesquisador. A classificação mais comum e simplista dos biomateriais divide-os em metais, cerâmicas, vidros, polímeros, carbonos e compósitos (junção de dois ou mais tipos de biomateriais). No entanto, com a tendência de modernização da ciência, os biomateriais ditos tradicionais estão sendo produzidos em conjunto com substâncias e compostos mais complexos, como as micromoléculas medicamentosas, proteínas terapêuticas, moléculas biológicas e populações de células vivas (Bhatia, 2010).

Além de tudo, as categorias de classificação dos biomateriais existentes fornecem uma visão geral das diferentes maneiras de classificar esses materiais essenciais para a medicina e a engenharia biomédica. Cada tipo de biomaterial tem suas próprias propriedades e aplicações específicas com base nas necessidades clínicas e biológicas. Portanto, as categorias dos biomateriais não são mutuamente excludentes e o biomaterial ideal é aquele que engloba várias características (Bhatia, 2010).

Então, basicamente, os biomateriais podem ser classificados quanto à sua origem, composição química, estrutura, interatividade com o corpo e aplicação médica. Quanto à origem, os biomateriais são divididos em naturais e sintéticos. Os naturais são aqueles derivados de fontes biológicas, como tecidos humanos, animais ou vegetais, alguns exemplos incluem o colágeno, a gelatina e o alginato (derivado de algas). Os biomateriais sintéticos são aqueles produzidos em laboratório e não possuem origem biológica, o maior exemplo deles são os polímeros sintéticos, como polietileno, silicone e polimetilmetacrilato (Pires; Bierhalz; Moraes, 2015).

Quanto à composição química, os biomateriais são classificados como metálicos, que incluem materiais de titânio, aço inoxidável e ligas metálicas usadas em implantes ortopédicos e dentários, como cerâmicos, que são geralmente compostos de cerâmica ou vidro e incluem os fosfatos de cálcio usados em sistemas de liberação de fármacos, e como poliméricos, que são feitos de polímeros sintéticos ou naturais e incluem o polietileno sintético, as proteínas como a fibroína e a gelatina, os polissacarídeos como a celulose o ácido hialurônico e os polinucleotídeos (Bernardo *et al.*, 2021; Romero; Trindade, 2018; Williams, 2009).

Quanto à estrutura, são divididos em biomateriais porosos, que possuem uma estrutura tridimensional com poros facilitando o crescimento celular e a vascularização do tecido biológico, e biomateriais não porosos, que são sólidos e não possuem porosidade significativa (Bernardo *et al.*, 2021; Parida; Behera; Mishra, 2012).

Quanto à interatividade com o corpo, os biomateriais são classificados como biocompatíveis, que são aqueles que interagem de forma benigna com os tecidos e sistemas

biológicos minimizando reações adversas, como bioinertes, que são aqueles projetados para não interagir com o corpo e geralmente são utilizados em aplicações de revestimento (implantes de metal puro) pois não reagem quimicamente com os tecidos, e como materiais bioativos, que são produzidos para provocar uma resposta biológica positiva no tecido promovendo adesão celular e regeneração, exemplos incluem biomateriais revestidos de hidroxiapatita para implantes ósseos (Bernardo *et al.*, 2021; Parida; Behera; Mishra, 2012).

Durante muito tempo, a visão convencional de biomateriais, que dita que eles são peças sólidas e tangíveis das quais os objetos são fabricados, prevaleceu. Porém, com a modernização da ciência e da tecnologia, as delimitações entre as classes de biomateriais têm se dissipado cada vez mais, dando lugar a conceitos de maior complexidade, como a nanotecnologia e agregação molecular. Portanto, a ciência moderna dos biomateriais engloba uma gama extensa de variadas tecnologias, substâncias e componentes biológicos mais complexos que devem ser incluídos nas categorizações de biomateriais, como as nanopartículas bioativas, os hidrogéis, os agentes solúveis de contraste, os biossensores, os sistemas biológicos que se autoagregam, células, vírus, plataformas de *drug delivery*, vacinas e os órgãos engenheirados (Williams, 2009).

1.3 Aplicações de biomateriais na medicina regenerativa

As principais aplicações dos biomateriais na medicina regenerativa incluem a substituição de partes do corpo que tenham perdido sua função devido à doença ou trauma, o auxílio no processo de cicatrização de tecidos, a correção de anormalidades corporais e o aperfeiçoamento da performance do organismo. De acordo com vários estudos científicos, existem inúmeras possibilidades de aplicações para os biomateriais, já que esta é uma área da biotecnologia que envolve vários campos de estudo da ciência, como a bioengenharia, a biologia celular e molecular, a toxicologia, a ciência dos materiais e a medicina (Parida; Behera; Mishra, 2012; Ratner, 2019).

Um dos papéis fundamentais dos biomateriais na engenharia de tecidos, por exemplo, é promover suporte mecânico temporário aos tecidos vivos, transporte de massa para gerar adesão, proliferação e diferenciação celular e controlar o tamanho e a forma do tecido regenerado. Além disso, os biomateriais podem ser aplicados em diversos campos da medicina sob várias formas, como nos implantes biomecânicos, nos órgãos artificiais, nos carreadores de medicamentos e nos dispositivos de ligação de tecidos (Oleksy; Dynarowicz; Aebisher, 2023). A Tabela 1 exemplifica a relação entre os biomateriais categorizados pela

classificação quanto à composição química e as suas aplicações. Já a Tabela 2 descreve os tipos de biomateriais utilizados em aplicações médicas diversas.

Tabela 1 – Biomateriais categorizados quanto à composição química e as suas aplicações.

Biomaterial	Aplicações
Polímeros naturais	
Ácido hialurônico	Carreador de células, substituto de fluido sinovial
Quitosana	Curativos, suporte para crescimento celular e dispositivo para liberação de drogas
Colágeno	Membranas e esponjas para revestimento de queimaduras, géis para hemostasia e suporte para crescimento de células
Fibroína	<i>Scaffolds</i> , lentes de contato, agentes de liberação de drogas e matriz para imobilização enzimática
Polímeros sintéticos	
Polietileno	Articulações totais para articulações e joelhos, <i>scaffolds</i>
Poliuretano	Proteção para implantes de longa duração
Poli(cloreto de vinila) (PVC)	Sacos para armazenagem de sangue
Cerâmicas	
Alumina e Zircônia	Confecção de acetábulo e cabeças femorais para artroplastias de quadril e implantes dentários
Fosfatos de cálcio	Regeneração tecidual e sistemas de liberação de fármacos
Vidros Bioativos	Reparo e regeneração óssea, reconstrução maxilo-facial e cirurgia de coluna vertebral
Metais	
Aço inoxidável	Stents, fios e implantes dentários, fixação de fraturas e instrumentos cirúrgicos
Ligas de Cobalto	Substituição de ossos e articulações, restaurações e implantes dentários, válvulas cardíacas
Titânio e ligas	Próteses de joelho e implantes dentários

Fonte: Adaptado de Romero e Trindade (2019)

Tabela 2 – Biomateriais utilizados em aplicações médicas diversas.

Aplicações	Biomateriais utilizados
Adesivo cirúrgico	Fibrina, poliuretano, cianoacrilato
Curativo de queimaduras	Pele de suíno, hidrogel, silicone
Implante mamário	Elastômero de silicone
Lentes de contato	Hidrogel de silicone
Implante coclear	Teflon, parileno, liga metálica platina-irídio
Carreadores de medicamentos	Hidrogel, silicone, poliésteres
Eletrodos	Platina
Válvula cardíaca	Carbono, pericárdio tratado
Próteses de joelho e quadril	Ligas metálicas de titânio, aço inoxidável, polietileno
Catéter de administração de insulina	Poliuretano, Teflon
Lentes intraoculares	Silicone, hidrogel, poli(fenetil metacrilato)
Próteses de córnea	Titânio, poli(metil metacrilato)
Veículo de condução dos nervos	Colágeno tipo I, poli(ácido glicólico), poli(vinil álcool)
Prótese ocular	Vidro, plástico
Prótese peniana	Elastômero de silicone
Suturas	Polipropileno, poli(ácido glicólico), seda
Malhas cirúrgicas ginecológicas	Teflon, polipropileno, tecido tratado
Substituto vítreo	Óleos de silicone, gases fluorados
Prótese dentária	Óxido de zircônia

Fonte: Adaptado de Ratner (2019)

Os biomateriais também são frequentemente usados na fabricação de implantes e próteses para substituir tecidos ou órgãos danificados. Alguns exemplos incluem os implantes dentários, próteses de quadril e válvulas cardíacas artificiais feitas de materiais biocompatíveis que substituem estruturas biológicas disfuncionais. Os biomateriais metálicos são o grupo mais utilizado na área de próteses e cirurgias, isso se deve ao fato de que os implantes de metais têm uma longa durabilidade de vida no corpo de quase 20 anos. Eles são usados principalmente como substitutos passivos durante a regeneração de fraturas, como dispositivos de fixação da coluna e como implantes de quadril e de articulações do joelho (Moghadasi *et al.*, 2022; Oleksy; Dynarowicz; Aebisher, 2023).

Já os biomateriais cerâmicos são usados especialmente nas áreas de ortopedia e odontologia, esses materiais são utilizados para produção de próteses e elementos artificiais dos ossos, como os ossos do canal auditivo e nasal e ossos orbitais. As cerâmicas também são bastante utilizadas como cimento para preenchimento ósseo ou selante de canais enervados na odontologia (Oleksy; Dynarowicz; Aebisher, 2023).

Os biomateriais também são usados em dispositivos médicos e terapias para tratar doenças cardiovasculares, como exemplo tem-se os stents vasculares feitos de ligas metálicas ou polímeros, que são usados para manter as artérias abertas e prevenir a obstrução, e os cateteres e válvulas cardíacas artificiais (Moghadasi et al., 2022; Oleksy; Dynarowicz; Aebisher, 2023).

A medicina oftalmológica, além de tudo, é uma área na qual os biomateriais são muito utilizados, muitas lentes de contato são feitas de hidrogéis e silicones, proporcionando correção visual e conforto. Outros exemplos são os implantes intraoculares feitos de materiais biocompatíveis, que substituem a lente natural do olho durante a cirurgia de catarata, e os implantes feitos de materiais vitrocerâmicos, capazes de devolver o volume perdido do globo ocular de pessoas portadoras de doenças como tumores, trauma ou glaucoma (Jornal Unesp, 2018; Nicolai, 2018).

Uma aplicação interessante dos biomateriais, que é muito empregada atualmente, é a liberação controlada de medicamentos ou *drug delivery*, permitindo tratamentos de longa duração e específicos para órgãos. Além do uso das cerâmicas nessa área, as matrizes poliméricas ou nanopartículas são biomateriais largamente empregados nessa terapia, elas podem ser carregadas com fármacos e implantadas no corpo para liberar os medicamentos gradualmente (Oleksy; Dynarowicz; Aebisher, 2023; Troy et al., 2021).

Além disso, os biomateriais são usados como enxertos para regeneração e reparo de tecidos, alguns exemplos são os enxertos de pele feitos de colágeno que são usados para tratar queimaduras graves e feridas e os *scaffolds* que são estruturas tridimensionais feitas de polímeros ou materiais naturais, como a nanocelulose bacteriana e o alginato de algas, que suportam o crescimento celular e a regeneração de tecidos, como osso, cartilagem e pele (Oleksy; Dynarowicz; Aebisher, 2023; Troy et al., 2021). Ademais, é importante destacar que muitos polímeros naturais, como o colágeno e a celulose, são usados na produção de inúmeros biomateriais, principalmente os hidrogéis e aerogéis.

1.3.1 Hidrogéis e aerogéis como biomateriais aplicados na medicina regenerativa

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros sintéticos ou naturais com característica viscoelástica, que conseguem absorver e reter grandes quantidades de água e possuem propriedades similares às dos tecidos vivos (Ahmed, 2015; Kramer; Macedo; Moura, 2020).

Para produzir um hidrogel é necessário que as ligações de seus componentes sejam cruzadas (do inglês, ‘*crosslinking*’) para gerar a rede polimérica através de interações covalentes ou não-covalentes. Isso permite que a estrutura do hidrogel possa ser manipulada de acordo com a aplicação final desejada. Além disso, os hidrogéis possuem uma capacidade hidrofílica excepcional, ou seja, podem reter grande quantidade de água em sua estrutura, isto se deve a vários fatores, como a composição da solução, a densidade das ligações cruzadas, e a técnica utilizada para sintetizá-los, que pode ser através de métodos de *crosslinking* físico ou químico (Catoira *et al.*, 2019).

Esses métodos de *crosslinking* são caracterizados pelo processo de gelificação ou polimerização do hidrogel, que acontece quando a mistura sofre transição de um estado de solução para um estado de gel, denominado de ponto de gelificação, que pode ser calculado através de análises reológicas (Catoira *et al.*, 2019).

Os hidrogéis possuem várias características vantajosas que fazem deles produtos atrativos para a pesquisa científica e para o mercado. Suas propriedades físico-químicas manipuláveis lhes conferem uma boa versatilidade para criar vários designs adaptados para a aplicação desejada. Algumas de suas propriedades vantajosas são: boa difusão de moléculas e células entre os poros, baixa toxicidade para células do corpo, biodegradabilidade, biocompatibilidade e similaridade com o ambiente fisiológico (Liu *et al.*, 2020).

Os hidrogéis também são classificados em diversas categorias, uma delas é a divisão dos hidrogéis naturais, que são subdivididos em três grupos de acordo com sua matéria-prima base: hidrogéis de proteínas, de polissacarídeos e de tecidos descelularizados. Esses grupos de hidrogéis são tipicamente formados de componentes protéicos e da matriz extracelular, o que explica suas características inerentes de bioatividade, biocompatibilidade e possibilidade de aplicação em tratamentos médicos, já que eles promovem diversas funções de atividade celular. Os principais tipos de hidrogéis naturais incluem os de elastina, colágeno, gelatina, fibrina e fibroína de seda (Catoira *et al.*, 2019).

A fibrina, a elastina e o colágeno são as principais proteínas encontradas na estrutura da matriz extracelular dos tecidos, as quais dão elasticidade e força para que as células funcionem corretamente, por isso os hidrogéis são considerados materiais promissores para sistemas de cultura de células e para a engenharia de tecidos. A fonte de extração dessas

proteínas é majoritariamente advinda dos animais, o colágeno, por exemplo, é extraído de tecidos de suínos ou de caudas de roedores, mas também pode ser obtido a partir do humor vítreo de peixes, como o atum, já a fibroína é extraída essencialmente de insetos (Catoira *et al.*, 2019).

Quanto aos aerogéis, estes são materiais altamente porosos e conhecidos por suas propriedades únicas, como baixa densidade, elevada área de superfície e isolamento térmico eficiente. Os aerogéis são denominados popularmente como "fumaça congelada" ou "ar sólido", devido ao seu aspecto leve e translúcido (Mazrouei-sebdani *et al.*, 2021; Nakahara, 2023).

Em 1931, Samuel Stephen Kistler revolucionou a ciência ao inventar os aerogéis, conforme relatado em um comunicado na revista Nature. Em colaboração com cientistas das Universidades do Pacífico e Stanford, na Califórnia, EUA, Kistler desenvolveu um método inovador de secagem de géis, utilizando a tecnologia de fluidos supercríticos. Essa abordagem consistia em substituir o líquido dos poros do gel por ar, originando os "aerogéis". Essa técnica inovadora resultou na minimização do encolhimento do material durante a secagem, que se apresentava como obstáculo durante os experimentos de retirada da água dos géis (Kistler, 1932; Aegerter; Leventis; Koebel, 2011; Dogenski, 2019; Nakahara, 2023).

Além disso, ao longo dos anos, observou-se uma evolução nos conceitos associados ao termo "aerogel". Devido à essa variação de conceitos, ainda não existe uma definição específica para esses materiais na literatura. A definição mais abrangente, proposta recentemente por Smirnova e Gurikov (2017), descreve os aerogéis como uma rede coloidal ou polimérica aberta, não fluida, composta por partículas ou fibras unidas livremente. Esses materiais são expandidos por um gás, resultando em uma baixa densidade e elevada área superficial (Dogenski, 2019). Baseando-se nisso, o procedimento de produção dos aerogéis consiste em fases simples e objetivas.

O processo de formação de aerogéis compreende duas etapas: a síntese da solução-gel e a secagem supercrítica. A síntese dos aerogéis inicia-se com a transformação de uma solução ou dispersão de partículas em um gel úmido, depois é realizada a secagem do gel por meio de técnicas como evaporação, liofilização ou secagem supercrítica. A etapa de produção da solução-gel caracteriza-se pela formação de uma suspensão coloidal por hidrólise e/ou condensação de materiais precursores, sendo fundamental para controlar a composição, estrutura e porosidade do aerogel. A etapa subsequente, ou seja, a secagem supercrítica, é realizada para remover o solvente do gel sem comprometer a estrutura porosa do biomaterial. Essas fases combinadas são essenciais para a obtenção precisa e controlada dos aerogéis,

garantindo as propriedades desejadas no material resultante (Maleki *et al.*, 2016; Dervin e Pillai, 2017; Dogenski, 2019; Nakahara, 2023). No entanto, é necessário ter conhecimento acerca dos componentes dos aerogéis, assim como da matéria-prima de que estes são feitos, para utilizar a melhor técnica de produção do biomaterial. Para isso, os aerogéis podem ser divididos em algumas categorias.

A classificação dos aerogéis frequentemente se baseia na composição química destes, sendo a divisão mais comum entre inorgânicos e orgânicos. No grupo dos inorgânicos, a sílica e seus derivados são os principais constituintes, mas também podem incluir óxidos metálicos, carbetos, nitretos ou compostos derivados de calcogênios. Já os aerogéis orgânicos se subdividem em quatro categorias: biopoliméricos, compostos por polímeros sintéticos, derivados de compostos fenólicos e aerogéis de carbono. Entre estas subdivisões, destacam-se os aerogéis biopoliméricos, que podem ser feitos a partir de polímeros naturais como o alginato, amido, ágar, pectina, albumina e, principalmente a celulose (Dogenski, 2019; Antonyuk *et al.*, 2015; De marco *et al.*, 2015; Bendahou *et al.*, 2014).

Devido à capacidade da celulose de criar estruturas fibrosas finas e robustas, ela se mostra ideal para a produção de aerogéis. Os aerogéis de celulose podem ser elaborados de diversas formas, como através da desintegração da celulose, da decomposição da madeira ou da biossíntese de nanofibras de celulose bacteriana (Nakahara, 2023)

1.4 Aproveitamento do resíduo da indústria pesqueira para obtenção do humor vítreo

Nos últimos anos, questões ambientais e econômicas têm incentivado o uso de alternativas ecológicas à exploração dos recursos naturais da Terra. Nesse contexto, a Comissão Europeia aprovou o "Crescimento Azul" (do inglês, Blue Growth) como uma estratégia de longo prazo para apoiar o desenvolvimento sustentável nos setores marítimos (Rajabimashhadi *et al.*, 2023; Rigogliuso *et al.*, 2023). Com o crescimento populacional global e o aumento do consumo de peixes, a quantidade de resíduos de peixe produzidos anualmente está aumentando, e resíduos comerciais e domésticos representam uma parte significativa desses subprodutos. Ademais, os resíduos de peixe têm efeitos prejudiciais no ambiente marinho, contribuindo para a poluição e emissão de odores desagradáveis, se tornando uma preocupação pública (Furtado *et al.*, 2022).

Em 2013, os peixes representaram cerca de 17% do consumo global de proteína animal e 6,7% de toda a proteína consumida. O consumo de proteína de peixe supera 50% em muitos países em desenvolvimento. O consumo humano de peixes aumentou de 67% (menos

de 40 milhões de toneladas) na década de 1960 para 87% (mais de 150 milhões de toneladas) em 2016. Estima-se que um bilhão de pessoas estejam diretamente ou indiretamente envolvidas na indústria pesqueira para subsistência. Do total de captura de peixes, 27% não é utilizado ou é perdido entre o desembarque e o consumo devido a descartes de baixo valor, problemas de armazenamento e deterioração. Estima-se que 567.474 toneladas de resíduos de peixes não utilizados foram geradas pelas indústrias de processamento de peixes da Índia somente durante 2015-16 (Wangkheirakpam *et al.*, 2019).

Aproximadamente 70% dos peixes e frutos do mar são processados antes de serem vendidos, resultando em enormes quantidades de resíduos sólidos provenientes de processos como degola, descascamento, evisceração, separação de barbatanas e escamas, e filetagem. Mais da metade do peso do peixe fresco se torna subprodutos da indústria pesqueira. A maioria desses subprodutos é enterrada ou queimada, causando problemas ambientais, de saúde e econômicos. A indústria da pesca, devido aos seus métodos de processamento, descarta ou transforma a maior parte dos resíduos em óleo e farinha de peixe de baixo valor, e uma pequena parte é usada como ingredientes baratos em rações animais. No entanto, essas partes descartadas contêm proteínas, vitaminas e minerais de alto valor bioquímico (Lionetto; Corcione, 2021; Rajabimashhadi *et al.*, 2023; Wangkheirakpam *et al.*, 2019).

Portanto, é de grande importância examinar métodos de reutilização de resíduos industriais e subprodutos da indústria da pesca. Além disso, um mérito significativamente negligenciado da indústria de frutos do mar é que os subprodutos da vida marinha são uma rica fonte de proteínas valiosas (10-25%) e lipídios, atraindo cada vez mais atenção para a ideia de usá-los como fontes de colágeno, por exemplo (Furtado *et al.*, 2022; Rajabimashhadi *et al.*, 2023).

Muitas iniciativas e programas têm sido implementados globalmente para prevenir o desperdício de alimentos, pois além de reduzir o custo da eliminação de resíduos, aumenta o investimento nos resíduos da indústria pesqueira e oferece a oportunidade de recuperar outras substâncias importantes, como óleos, proteínas, pigmentos, peptídeos bioativos, aminoácidos, colágeno, quitina, gelatina, entre outros (Lionetto; Corcione, 2021; Rajabimashhadi *et al.*, 2023).

Várias pesquisas foram realizadas para utilizar peixes e subprodutos para a produção de produtos comercialmente valiosos. A baixa massa molecular, simplicidade de extração, alto teor de colágeno, facilidade de absorção, biocompatibilidade, baixo risco de transmissão de doenças de animais para humanos, baixa contaminação ambiental e ausência

de preocupações éticas ou religiosas tornam os resíduos da indústria pesqueira ideais para o desenvolvimento de produtos (Furtado et al., 2022; Rajabimashhadi *et al.*, 2023).

1.5 Organismos marinhos como fontes alternativas para prospecção de novos bioativos

Como dito anteriormente, os resíduos da indústria pesqueira, sobretudo os resíduos de peixes, são fontes valiosas de novos bioativos com aplicações diversas na medicina. Isso se deve ao fato que muitos dos agentes terapêuticos inovadores podem ser encontrados no ambiente marinho, que ocupa quase 70% da superfície terrestre e tem se mostrado uma fonte rica de substâncias biologicamente ativas, atraindo a atenção de pesquisadores, empresas e indústrias (Macedo *et al.*, 2021).

Essas substâncias bioativas são produzidas pelos organismos marinhos, que evoluem para se adaptar às condições ambientais únicas e extremas dos mares, como variações de pressão, luz, temperatura, salinidade e, principalmente, predação e competição. Muitos desses compostos bioativos produzidos não são encontrados de forma similar no ambiente terrestre e, portanto, possuem novas aplicações biotecnológicas em diferentes campos da ciência e da medicina (Karthikeyan; Joseph; Nair, 2022; Macedo *et al.*, 2021; Merquiol *et al.*, 2019; Rigogliuso *et al.*, 2023).

No campo da medicina, muitos desses compostos com potencial farmacológico são derivados dos cnidários sésseis, como as anêmonas e os corais. O extrato desses organismos é aplicado essencialmente na produção de *scaffolds* para procedimentos de enxertia, já que possuem qualidade e similiaridade estrutural com os ossos humanos (Rigogliuso *et al.*, 2023)

Algumas moléculas, como os lipídeos e ácidos graxos também são substâncias biologicamente ativas encontradas abundantemente no ecossistema marinho, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs), como aqueles do tipo ômega 3. Os PUFAs são bioativos altamente benéficos para a proteção contra doenças cardiovasculares, possuem ação antioxidante, regulam as respostas inflamatórias através da produção de mediadores biológicos e podem ser encontrados em algas, fungos, pequenos camarões e em diversas espécies de peixes (Hamed *et al.*, 2015).

Outros compostos produzidos pelos seres marinhos são os polissacarídeos, também chamados de carboidratos, que são moléculas bioativas encontradas majoritariamente nas macro e microalgas do ecossistema marinho, exemplos notáveis incluem o ágar, as carragenanas e o alginato. Esses polissacarídeos possuem a capacidade de

se ligarem às moléculas de água formando um gel, que é utilizado extensivamente em diversas áreas, como na indústria alimentícia, na farmacologia e na cosmetologia, principalmente para a formação e estabilização de emulsões. Outros carboidratos, como os glucanos extraídos das algas pardas, foram identificados como reguladores do metabolismo intestinal, influenciando a estrutura do muco, do pH intestinal e na formação de ácidos graxos de cadeia curta (Hamed *et al.*, 2015).

Outro grupo de moléculas que podem ser encontradas nos organismos marinhos são as proteínas e peptídeos. Atualmente, existe uma proteína bioativa que está sendo muito visada e é produzida principalmente por peixes e algas. Essa proteína é o colágeno, uma substância de alto valor agregado e possui diversas aplicações nas áreas da biomedicina, farmacologia e cosmetologia. O colágeno também pode ser extraído de animais marinhos invertebrados, como os ouriços, as lulas, os camarões e as estrelas do mar (Rigogliuso *et al.*, 2023). Além disso, os peptídeos, produtos da hidrólise enzimática das proteínas, também podem ser isolados de várias fontes marinhas, incluindo algas, crustáceos e principalmente os peixes. Esses peptídeos possuem diversas funções biológicas interessantes que já foram reportadas em alguns estudos, como atividade antitrombótica, anti-hipertensiva, antimicrobiana e funções imunomodulatórias. Pesquisas relatam que peptídeos extraídos de atum possuem forte efeito antioxidante, mais poderoso que a vitamina E (Hamed *et al.*, 2015).

Dentro dos diversos tipos de bioativos que podem ser encontrados nos organismos marinhos, o humor vítreo dos olhos dos peixes se destaca como uma fonte promissora de compostos para aplicação em produtos terapêuticos da medicina, devido à facilidade de extração desse tecido do peixe e à sua composição molecular diversificada.

1.6 Características morfológicas e moleculares gerais do humor vítreo

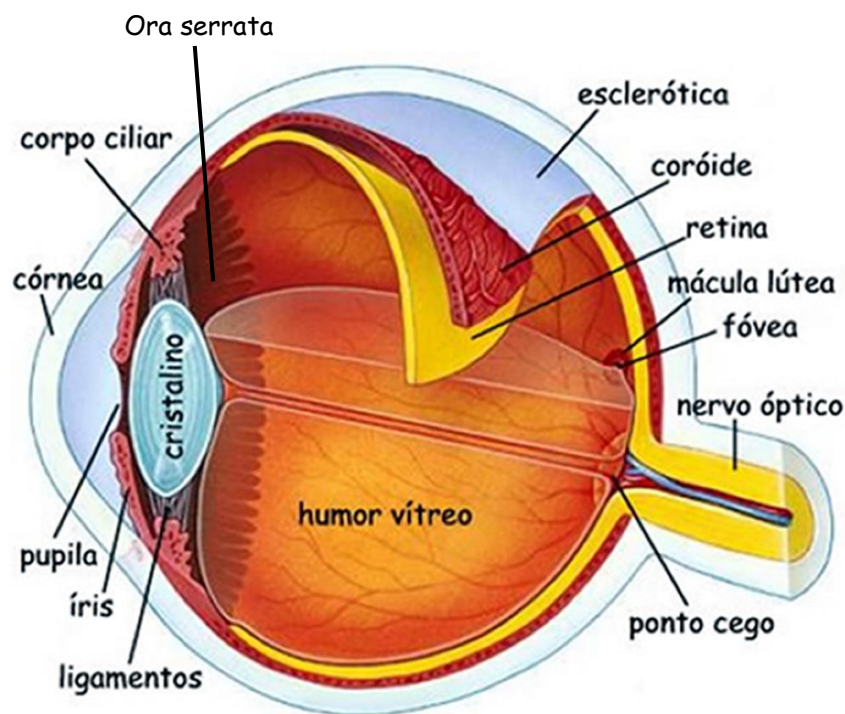
O humor vítreo é uma substância gelatinosa e transparente que preenche o espaço no interior do olho. Ele é encontrado em diversas espécies animais, de artrópodes a mamíferos. Sua transparência dificulta a visualização de sua estrutura, mas foram desenvolvidos métodos, como a microscopia de campo escuro e a biomicroscopia de lâmpada de fenda, para estudá-lo com sucesso (Kleinberg *et al.*, 2011).

Os estudos sobre o humor vítreo revelam que ele é uma parte do olho que preenche o espaço entre a lente e a retina, ocupando a parte central de toda a estrutura. O corpo vítreo se destaca por ser a maior porção ocular em volume, constituindo cerca de 80% do globo ocular. Além disso, ele desempenha um papel essencial no crescimento dos olhos e

na formação de suas estruturas, influenciando principalmente no desenvolvimento da retina pigmentada. O humor vítreo também desempenha papéis essenciais na biomecânica e na ótica, além de possuir funções bioquímicas e fisiológicas relevantes (Li *et al.*, 2023; Kleinberg *et al.*, 2011; Sebag, 1989).

Algumas pesquisas revelam que a composição do humor vítreo não é homogênea e consiste em várias partes com diferentes densidades e composições bioquímicas diversas. A parte mais próxima da retina é bastante densa e é conhecida como córtex vítreo, e a base vítrea, que cobre a ora serrata, apresenta densidade mais elevada que o córtex vítreo. Já a interface entre o humor vítreo e a retina é composta por uma membrana complexa chamada interface vítreo-retiniana, que varia em espessura e é mais espessa na área da mácula (Kleinberg *et al.*, 2011; Sebag, 1989), a Figura 1 demonstra melhor o humor vítreo presente na estrutura básica do globo ocular humano.

Figura 1 – Estrutura básica do globo ocular humano



Fonte: Adaptado de Centro Capixaba de Olhos. Acesso em: <https://ccolhos.com.br/portfolio/o-olho/>.

A maior parte do corpo vítreo é composta por água e uma parte desta está ligada a proteínas e glicosaminoglicanos. As proteínas, embora em pequena quantidade, estão

presentes em grande variedade, com destaque para a presença de albumina e proteínas ligadoras de ferro, como a transferrina. Já o colágeno, é uma proteína abundante no corpo vítreo, sendo o colágeno do tipo II presente em maior quantidade (Kleinberg *et al.*, 2011).

Os glicosaminoglicanos, incluindo o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina e o sulfato de heparana, são componentes importantes que influenciam na viscosidade do corpo vítreo e participam de interações da rede de fibras dessa estrutura (Li et al., 2023; Kleinberg *et al.*, 2011; Sebag, 1989).

O humor vítreo também contém açúcares, como glicose e ácido lático, em concentrações específicas. Já o ácido ascórbico (vitamina C) é encontrado em grande quantidade no corpo vítreo, já que sua presença está associada à absorção de luz ultravioleta e captação de radicais livres. Além disso, o ácido ascórbico desempenha papéis na liquefação do corpo vítreo durante o envelhecimento, na inibição de neovascularização e na prevenção de cataratas (Sebag, 1989).

Ácidos graxos insaturados, como prostaglandinas, também estão presentes no corpo vítreo e desempenham funções importantes, como prostaglandina E2, prostaglandina F2 alfa, prostaciclina e tromboxano, que possuem níveis elevados no corpo vítreo humano (Kleinberg et al., 2011).

O humor vítreo contém três tipos de células: hialócitos, fibroblastos e macrófagos. Os hialócitos são distribuídos na superfície do corpo vítreo próxima à retina. Estudos indicam que os hialócitos podem desempenhar um papel na síntese de ácido hialurônico e de colágeno, no entanto, evidências sugerem que eles são responsáveis pelo metabolismo das glicoproteínas e dos glicosaminoglicanos do humor vítreo (Sebag, 1989). Os fibroblastos representam cerca de 10% das células do córtex vítreo e pesquisas sugerem que sua função esteja relacionada com a fagocitose celular e secreção de colágeno durante as fases do envelhecimento. Já os macrófagos desempenham funções de fagocitose de células e partículas estranhas no olho. A viscosidade do corpo vítreo resulta da presença de fibras de colágeno suspensas em ácido hialurônico, formando uma rede e conferindo-lhe propriedades viscoelásticas. O colágeno é responsável por fornecer solidez à estrutura do humor vítreo e o ácido hialurônico, devido à sua contribuição osmótica, tem a capacidade de conferir um aspecto inflado ao humor vítreo (Kleinberg *et al.*, 2011, Sebag, 1989).

O corpo vítreo, durante o período em que o indivíduo está acordado, fica sujeito a estresse mecânico, atrito e vibração, portanto o humor vítreo possui a função principal de absorção de choques, devido à sua alta concentração de ácido hialurônico. Além disso, outras funções essenciais do humor vítreo são a transmissão da luz visível e infravermelha próxima,

a atuação como suporte da cápsula da lente, facilitando o processo de acomodação do olho, a proteção ocular, atuando como barreira para várias substâncias bioquímicas e células, e a inibição da proliferação, inflamação e neovascularização dos olhos (Li *et al.*, 2023; Kleinberg *et al.*, 2011).

1.6.1 Humor vítreo de peixes

Após uma extensa revisão bibliográfica, constatou-se uma notável escassez de informações abrangentes sobre o humor vítreo de peixes. Poucos estudos específicos foram conduzidos nessa área, limitando o acesso a dados substanciais que abordem a composição e características desse componente ocular em espécies piscícolas.

Dentre os escassos recursos disponíveis, destaca-se o trabalho de Rongni Li *et al.* (2023), cujas pesquisas ofereceram contribuições para o entendimento do humor vítreo em peixes, com foco particular na espécie *Carassius auratus*, em linguagem popular, peixe-dourado. O humor vítreo do peixe-dourado foi analisado por um analisador bioquímico totalmente automatizado, revelando a presença de 20 componentes bioquímicos séricos, incluindo proteína total, albumina, grelina, ácidos biliares totais, glicose, potássio, sódio, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL, LDL colesterol, onde 11 indicadores apresentaram concentrações inferiores no humor vítreo em comparação com o soro sanguíneo retirado do peixe-dourado. Alcalina fosfatase, ácidos biliares totais, ureia, cloreto, cálcio, creatinina e colinesterase mostraram concentrações semelhantes entre o humor vítreo e o soro, enquanto glutamina transaminase e gama-glutamyltransferase exibiram concentrações significativamente superiores no humor vítreo. A amostra de humor vítreo foi obtida do meio do corpo vítreo do peixe-dourado, onde nenhuma célula foi encontrada. A análise comparativa com estudos anteriores indicou que muitos componentes séricos estavam presentes no humor vítreo, porém em concentrações menores. A análise também revelou diferenças notáveis nos níveis de glicose, creatinina e ureia em comparação com seres humanos falecidos, possivelmente devido ao aumento da permeabilidade da barreira sangue-olho após a morte. A concentração de Ca^{2+} no humor vítreo do peixe-dourado celeste foi semelhante à dos humanos, sugerindo possíveis diferenças nos processos de transporte iônico e metabolismo entre os dois. Experimentos de extração de fluidos oculares e sanguíneos não mostraram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência subsequente em comparação com peixes-dourados não experimentais. As análises sanguíneas revelaram contagens normais de células sanguíneas e hemoglobina, com algumas diferenças notáveis nos índices bioquímicos entre o humor

vítreo e o soro.

Diante dessa lacuna de conhecimento, ressalta-se a importância de incentivar e apoiar futuras investigações sobre o humor vítreo de peixes, visando a ampliação do entendimento científico nessa área específica. A realização de estudos adicionais contribuirá significativamente para o avanço do conhecimento oftalmológico e biológico, promovendo uma compreensão mais abrangente das características e funções do humor vítreo em contextos zoológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Formular um aerogel à base de celulose bacteriana funcionalizado com proteínas do humor vítreo de atum (*Thunnus albacares*) e fazer uma caracterização físico-química e biológica parcial deste biomaterial.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- I. Validar as etapas de coleta, processamento e armazenamento do humor vítreo (HV) de atum;
- II. Padronizar o processo de extração de proteínas do HV;
- III. Realizar a caracterização biológica do HV;
- IV. Produzir um aerogel à base de celulose bacteriana funcionalizado com o HV;
- V. Realizar a caracterização físico-química do aerogel formulado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e legais do uso do atum (*Thunnus albacares*)

Este trabalho, embora tenha utilizado um material de origem biológica, isto é, o humor vítreo de atum (*Thunnus albacares*), não foi necessário seu cadastramento no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

(SisGen) devido ao fato de a espécie *T. albacares* não ser exótica, nativa nem endêmica da região e, ademais, o material utilizado se caracteriza como resíduo industrial.

3.2 Coleta dos olhos de atum (*T. albacares*)

Os globos oculares de atum (*T. albacares*) foram coletados na indústria de processamento de atum, mais especificamente, na empresa Robinson Crusoe localizada no município de São Gonçalo do Amarante – CE. Os olhos de atum foram removidos dos animais ainda frescos, com a carcaça íntegra. O pré-processamento das amostras foi realizado dentro da sede da empresa, respeitando todos os protocolos sanitários estabelecidos pelo setor de qualidade Robinson Crusoe. A remoção dos olhos de atum foi feita com a utilização de instrumental cirúrgico e os olhos foram acondicionados em solução salina (NaCl, 150 mM) em isopor com gelo até serem transportados ao Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os olhos coletados foram então submersos em álcool 70% por 5 min para diminuir a sua carga microbiana externa natural. Em seguida foram utilizados para remoção do humor vítreo ou armazenados em recipientes limpos e congelados em freezer a -20 °C.

3.3 Processamento do humor vítreo (HV) de atum

Os olhos de *T. albacares*, já previamente limpos e em temperatura ambiente, foram colocados em uma placa de isopor limpa e recoberta com plástico filme. O olho foi imobilizado com auxílio de alfinetes. Com a ajuda de uma lâmina e um bisturi, a região anterior do globo ocular (próximo a região de inserção do nervo ótico) foi cortada em formato de cruz até aproximadamente metade do globo. O HV foi despejado em tubo de centrifuga e armazenado em freezer -20 °C.

3.4 Extração de proteínas do HV de atum (*T. albacares*)

Após os processos de remoção do HV de *T. albacares*, o material recolhido foi submetido à processos de extração de proteínas solúveis. O HV foi adicionado na proporção 1:2 (p/v) em tampão PBS pH 7,4, junto com esferas de vidro, em tubo de centrifuga de 50 mL. O tubo foi vortexado por mais ou menos 1 min e, em seguida, foi centrifugado a 14.0000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, foi adicionado mais 1 volume do tampão PBS

e repetido os passos anteriores para uma re-extração. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 µm, congelados em freezer -20 °C e depois liofilizados.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os extratos proteicos gerados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras conforme a metodologia de Laemmli (1970), com modificações. Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 12,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1%. A mobilidade eletroforética foi realizada a 25 mA em uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 8,3) contendo SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min e centrifugadas a 1.000 RCF por 5 min à temperatura ambiente. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,05%, preparado em uma solução de metanol: ácido acético: água (1:3,5:8, v/v/v). Foi utilizado como marcador molecular o marcador *LMW-SDS Marker Kit* da GE HealthCare.

3.6 Produção de Celulose Bacteriana (CB)

Para a produção das membranas de celulose bacteriana (CB) foram utilizadas cepas de *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 53582) e o procedimento foi realizado no Laboratório de Biomateriais e Bioprotudos da UFC. Inicialmente, foi preparado o meio de cultura Hestrin e Schramm (HS) para preparação do inóculo, para isso foi utilizado 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 1,15 g/L de ácido cítrico e 2,7 g/L de fosfato de sódio dibásico, dissolvidos em água destilada e ágar 1,5%. A ativação do microrganismo ocorreu através de esgotamento de colônia do *K. hansenii* a 30 °C durante 72 h em meio HS-ágar. Em seguida, parte das colônias bacterianas foram removidas e colocadas em frasco Scott, contendo 100 mL do meio HS, após isso, foram incubadas a 30 °C por mais 3 dias. Depois disso, foi adicionado 5% (v/v) do inóculo em frascos Scott com 100 mL de meio líquido HS, e incubado durante 5-6 dias a 30 °C (Hestrin; Schramm, 1954).

Após o período de incubação, as membranas de CB foram lavadas em água corrente e, posteriormente, iniciou-se o processo de purificação, que consistiu em imergir as membranas em água destilada e aquecê-las a 80 °C por 1 h. Esse procedimento foi realizado

duas vezes para remover o excesso de meio de cultura e o conteúdo microbiano. Para a remoção completa das bactérias e do meio de cultura, a CB foi tratada duas vezes com uma solução de K_2CO_3 0,3 mol/L a 80 °C por 1 h. Finalmente, as membranas de CB purificadas foram lavadas com água destilada a 25 °C até atingirem pH neutro (Hestrin; Schramm, 1954).

Após a obtenção das membranas de CB, a elas foram adicionadas água deionizada e carboximetilcelulose (CMC) nas seguintes proporções: CBúmida / H_2O / CMC = 180 g / 700 mL / 3,6 g. Todos os componentes foram triturados em processador elétrico até a obtenção de uma solução viscosa e até que as fibras de CB ficassem curtas e não conseguissem mais ser trituradas pelo processador.

3.7 Produção de aerogel de celulose bacteriana com alginato de sódio e HV

As matrizes foram formuladas possuindo como base as soluções de CB desconstruída a 25% (p/v) com adição de CMC a 0,5% (p/v).

Em adição à base de CB desconstruída foi adicionado um reforço de alginato de sódio (AL) em diferentes concentrações. Foram testadas incorporações de AL a 2%, 3% e 5% p/v com o auxílio de um agitador mecânico de hélice até a completa dissolução do AL. As blendas de CB-AL resultantes foram reticuladas de duas formas diferentes com $CaCl_2$ 0,5 M por 30 min.

As duas metodologias de reticulação testadas nas matrizes de CB-AL, tiveram como objetivo avaliar a influência desses métodos na modificação da porosidade do biomaterial final. A primeira metodologia (M1), consistiu em verter as blendas formuladas em moldes (placas de 24 poços ou placas de Petri), logo em seguida reticular com $CaCl_2$, congelar *overnight* a -20 °C e depois liofilizar (liofilizador - LIOTOP L101) por 24 h até a completa secagem. A segunda metodologia (M2), consistiu em verter as blendas nos moldes, incubar em dessecador com pressão reduzida de 200 μ mHg por 30 min, congelar os moldes *overnight* a -20 °C, realizar a liofilização por 24 h até a completa secagem, reticular com $CaCl_2$, realizar novo congelamento *overnight* a -20 °C e liofilizar novamente por 24 h até completa secagem do material.

Junto às blendas de CB-AL foram adicionadas nas concentrações de 1 mg/mL e de 10 mg/mL das proteínas liofilizadas provenientes do HV de *T. albacares*. As proteínas foram incorporadas às blendas durante o processo de mistura para serem obtidas soluções homogêneas antes da reticulação. As blendas formadas a partir deste processo foram nomeadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Blendas de celulose bacteriana, alginato e proteínas do humor vítreo

Blenda	Celulose Bacteriana (%)	CMC (%)	Alginato (%)	Proteínas do HV (mg/mL)
CB-AL2	25	0,5	2	0
CB-AL2-HV	25	0,5	2	1
CB-AL3	25	0,5	3	0
CB-AL3-HV	25	0,5	3	1
CB-AL5	25	0,5	5	0
CB-AL5-HV	25	0,5	5	1
CB-AL2-HV10	25	0,5	2	10

Fonte: elaborado pela autora.

3.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O estudo dos espectros de FTIR foi realizado com o intuito de avaliar a interação entre os constituintes das membranas por meio da presença de grupos funcionais que os compõem. Foi utilizado o equipamento modelo *Spectrum Two Perkin Elmer*®. A faixa de leitura foi entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas com o intuito de caracterizar o material quanto à sua morfologia e dispersão das vesículas extracelulares. Essas análises foram realizadas na Central Analítica da UFC (financiada pelos programas Finep-CT-INFRA, Pró-Equipamentos CAPES, e MCTI-CNPq-SisNano 2.0). As amostras foram montadas em *stubs* utilizando-se de fitas de carbono e recobertas com uma fina camada de prata (20 nm) usando um aplicador *Sputter* (K650, Emitech, França) e observadas usando um microscópio eletrônico de varredura *Quanta 450 FEG* (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA).

3.10 Análise da porosidade

Para determinar as medidas de porosidade dos materiais híbridos, as amostras foram pesadas previamente úmidas e após liofilização, com o intuito de calcular o volume total de poros, a partir do cálculo de volume de água contido no material. Para determinação dessas medidas utilizou-se o método descrito por Zeng e Ruckenstein (1996). A porosidade foi calculada através da Equação 1 e 2.

$$\text{Porosidade (\%)} = \left(\frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{seca}}}{d_{\text{água}}} \right) \times \left(\frac{100}{V_{\text{úmido}}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

$$V_{\text{úmido}} = \frac{\pi \times D^2 \times h}{4} \quad \text{Equação 2}$$

Onde a Porosidade (%) da membrana é dado pelas variáveis: $m_{\text{úmida}}$, que é a massa úmida de cada membrana aferida após cada tempo; m_{seca} , que é dada pela massa das membranas liofilizadas aferidas ao início do processo; $d_{\text{água}}$, que é a densidade da água pura à temperatura na qual a análise foi realizada (25 °C); $V_{\text{úmido}}$, que é o volume das membranas intumescidas após cada período de tempo. $V_{\text{úmido}}$ é dado pelas variáveis: D (diâmetro da membrana) e h (altura da membrana).

3.11 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos materiais foi avaliada pelo método indireto, seguindo a metodologia protocolada pela norma regulamentadora ISO10993-12 (2012) no qual a viabilidade celular é medida após a exposição das células aos extratos da amostra. Para a preparação dos extratos, inicialmente, as amostras foram cortadas em formato circular com área aproximada de 1 cm² e esterilizadas por exposição a luz UV por 20 min de cada lado do disco em câmara de fluxo laminar. As amostras estéreis de cada material foram colocadas em placas de 24 poços com 1 mL de meio de cultura, sendo parte delas com DMEM suplementado (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina) e a outra parte com α -MEM suplementado (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina). Posteriormente foram incubadas a 37 °C por 24 h (5% de CO₂ e 95% de umidade). Após o período de incubação, os extratos

obtidos foram coletados e armazenados em tubos do tipo Falcon, tomando a precaução de não recolher também partes das membranas.

Fibroblastos de camundongo (L-929) foram semeados em meio DMEM suplementado (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina) em placas de 96 poços com densidade de 6×10^3 células/poço, seguida de incubação a 37 °C (5% de CO₂ e 95% de umidade) por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e adicionado 100 µL dos extratos nos poços e as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 e 48 h (5% de CO₂ e 95% de umidade). Após esses períodos, os extratos foram removidos dos poços, limpos com tampão de PBS (pH 7,4), e posteriormente adicionou-se 120 µL de meio de cultura contendo 10% (concentração final de 2,5 mg/L) da solução de Resazurina e então as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 4 h (5% de CO₂ e 95% de umidade). Após esse período, foram transferidos 100 µL da solução de Alamar *Blue* metabolizado pelas células para uma nova placa de 96 poços e os poços foram lidos em leitor de microplacas (*SpectraMax i3x*, *Molecular Device*, Sunnyvale, EUA), em modo fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 560 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 590 \text{ nm}$). O controle negativo foi feito expondo as células ao meio de cultura, e o controle positivo foi feito expondo as células à uma solução de DMSO 40% diluído em meio DMEM, tornando assim, nessa concentração, o ambiente altamente citotóxico para as células. A porcentagem de células metabolicamente ativas foi calculada usando a Equação 3:

$$V_c (\%) = \frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{controle}}} \quad \text{Equação 3}$$

Temos que V_c representa a viabilidade celular, F_{amostra} representa a fluorescência correspondente ao poço onde as células foram cultivadas na presença do extrato da amostra e F_{controle} representa a fluorescência correspondente ao poço onde as células foram cultivadas somente na presença de seus respectivos meios de cultura.

Os ensaios foram realizados em triplicata ($n = 3$), com o intuito de obter melhor representatividade dos resultados.

3.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste 2 way ANOVA com teste de *Tukey's multiple comparisons test*, com auxílio do programa *GraphPad*

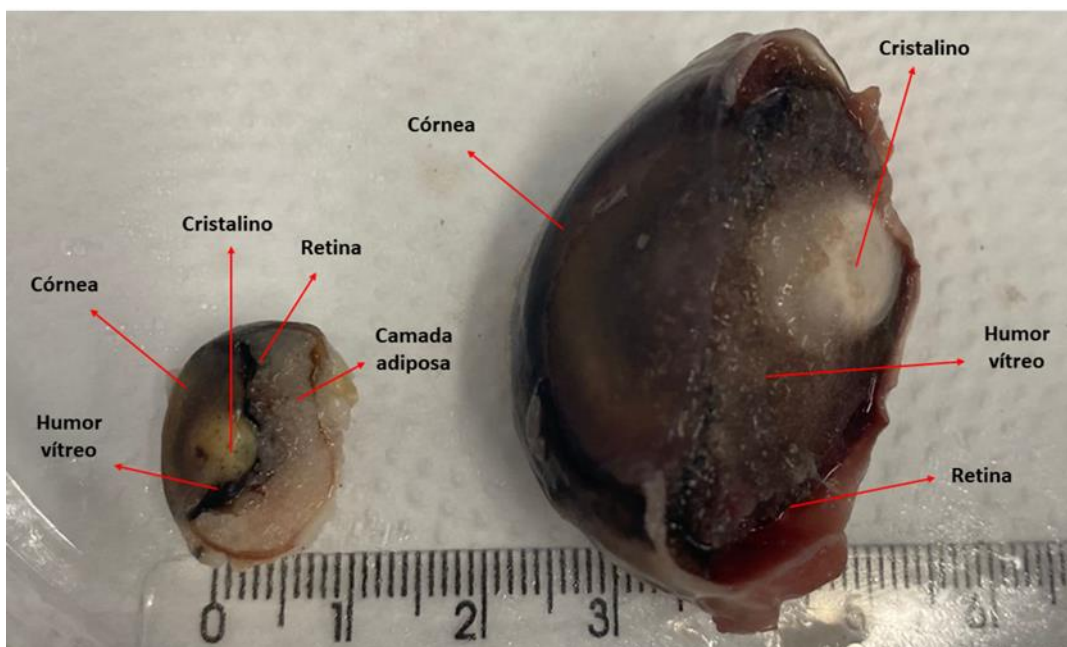
Prism (GraphPad Prism 9.4.0.673 - GraphPad Software LLC - Dotimatics, Boston – MA, EUA). O nível de significância adotado foi $P < 0,05$, de acordo com Pimentel-Gomes (1987) [40].

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Coleta e extração do HV de atum

Foi realizada uma parceria com uma empresa que trabalha com pescado, a Robinson-Crusoé, com sede no Pecém, uma cidade distante 51 Km de Fortaleza, para o fornecimento dos globos oculares de atum. A variedade *yellow fin* (*Thunnus albacares*) foi selecionada por ser, dentre as espécies que a empresa parceira trabalha, a de maior disponibilidade e com um globo ocular avantajado. Na Figura 2, vemos uma comparação entre a morfologia e o tamanho relativo do globo ocular de tilápia e de atum.

Figura 2 – Morfologia comparada dos globos oculares de tilápia e de atum

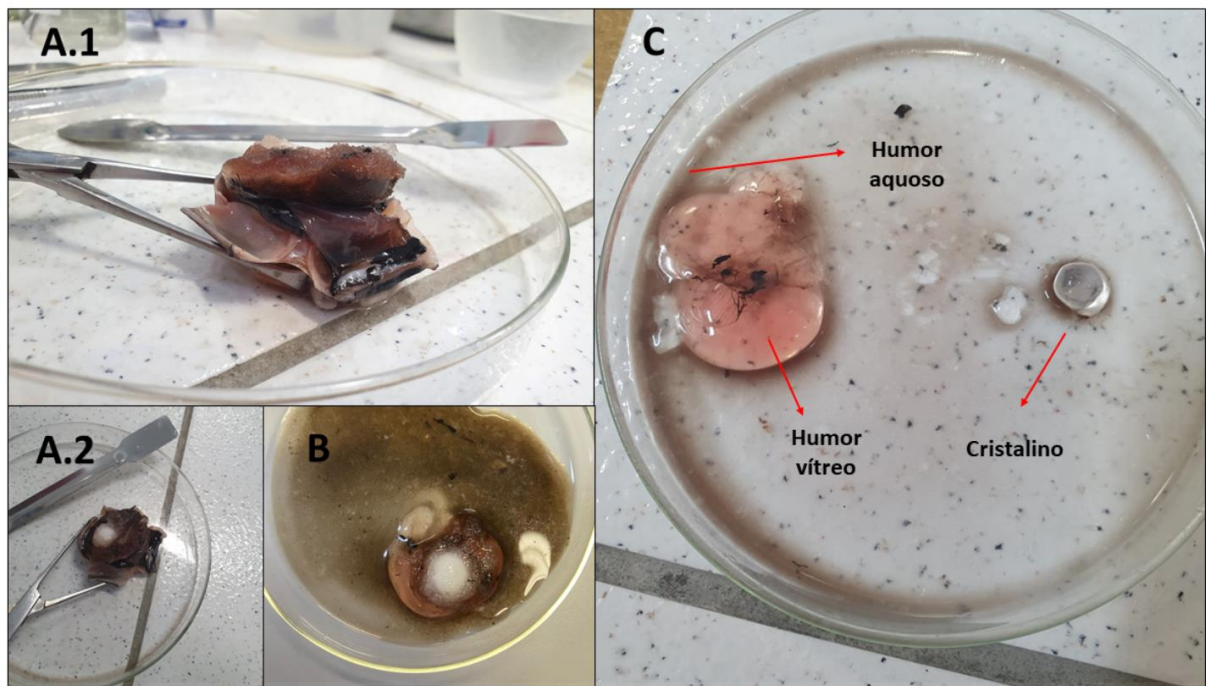


Fonte: elaborado pela autora.

Para a coleta do HV dos olhos foram testadas algumas metodologias descritas para remoção deste tecido mais comumente aplicadas em outras espécies, como porcos, para estudos da vitro-dinâmica, e humanos (Murali *et al.*, 2015) ou mesmo metodologias descritas para outra espécie de peixe (Goto, 2016). A utilização de agulhas para coleta direta do HV se

mostrou ineficaz. Porém, a técnica cirúrgica adaptada de Murali *et al.* (2015), descrita no item 3.2. da metodologia e exemplificada na Figura 4, demonstrou bom isolamento do tecido fresco. Além disso, foram testadas algumas metodologias para isolamento do tecido congelado com o objetivo aumentar vida útil dos olhos coletados. Foi realizada, então, a dessecação do órgão congelado a partir da parte anterior do olho, próximo a região do nervo ótico, com a utilização de instrumentação cirúrgica. A partir dessa técnica, o tecido foi removido de duas formas distintas. Quando completamente congelado, o HV foi removido juntamente com o humor aquoso e essa amostra foi denominada de HVA. O HVA, quando parcialmente descongelado, era separado do HV espontaneamente e podia ser obtido o HV íntegro, como observado na Figura 3.

Figura 3 – Conteúdo interno do globo ocular de atum congelado e após descongelamento parcial



Fonte: elaborado pela autora. Legenda: A. Visão lateral (A.1) e superior (A.2) do conteúdo interno do globo ocular. B. Separação do humor aquoso (líquido escuro) do humor vítreo (bloco mais viscoso) junto com o cristalino. C. Humor vítreo e cristalino separados, após aspiração e descarte do humor aquoso. Um pouco do líquido escuro do humor aquoso ainda é visível.

Figura 4 – Extração do humor vítreo aquoso de atum.



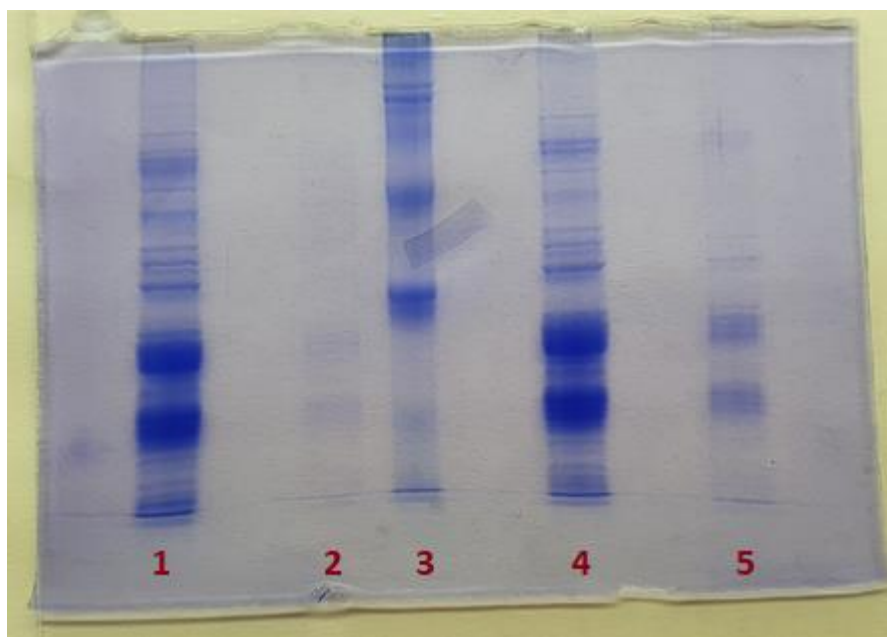
Fonte: elaborado pela autora.

Tanto a amostra de HV quanto a de HVA foram utilizadas para análise de suas frações proteicas solúveis e avaliação de citotoxicidade para que fosse possível avaliar o potencial uso dessas proteínas como bioativos e se haveria distinção de atividade entre as amostras.

4.2 Extrato proteico e SDS-PAGE

Foram realizadas duas extrações, com tampão PBS (pH 7,4) na proporção 1:2 (p/v) de HV para tampão. O mesmo volume foi utilizado na re-extração. Além disso, foram utilizadas pérolas de vidros durante o processo de homogeneização em vortex para aumentar a lise do tecido e a solubilização das proteínas. O processo foi realizado em tubos Falcon de 50 mL e as amostras foram posteriormente centrifugadas a 14000 RPF por 5 min para separação de restos de tecido do extrato proteico bruto. O conteúdo proteico foi avaliado por SDS-PAGE (12,5%) e o resultado está evidenciado na Figura 5.

Figura 5 - SDS-PAGE (12,5%) das proteínas do HV de atum

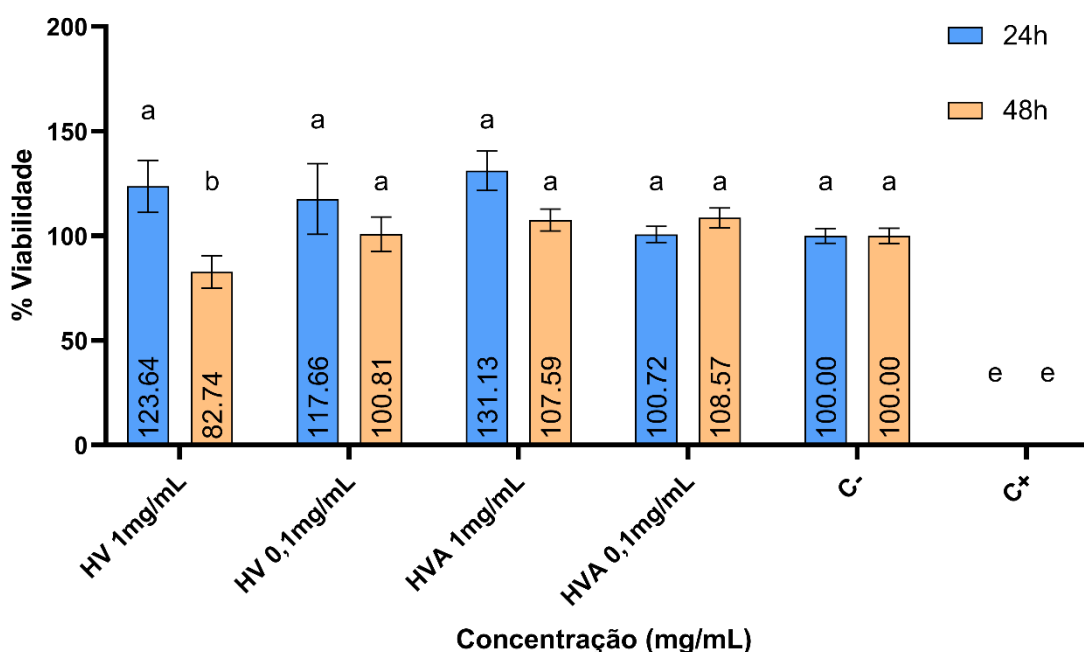


Fonte: elaborado pela autora. Legenda: Raia 1 - 1º extração HV atum em PBS pH 7,4. Raia 2 - 2º extração HV atum em PBS pH 7,4. Raia 3 - marcador molecular Sigma *wide range*. Raia 4 - 1º extração HV + Haq atum em PBS pH 7,4. Raia 5 - 2º extração HV + Haq atum em PBS pH 7,4.

De maneira qualitativa, não é possível observar diferenças entre os grupos proteicos extraídos das amostras de HV e HVA. As bandas visualizadas nas raias 1 e 4 apresentam similaridades no peso molecular aparente e na quantidade de bandas em cada raia. Quanto à necessidade da re-extração do material, é possível notar um decréscimo significativo na segunda extração em relação à primeira, o que indica que a maioria das proteínas solúveis foram solubilizadas e obtidas na primeira retirada.

Já o ensaio de citotoxicidade contra células de fibroblastos de camundongo (L-929) demonstrou que as amostras de HV e HVA, em ambas as concentrações testadas, não foram citotóxicas (viabilidade celular superior a 70%) tanto no período de 24 h como em 48 h de ensaio (Figura 6). A análise estatística não mostrou diferenças significativas entre as amostras, com exceção da amostra de HV 1 mg/mL no tempo de 48 h que apresentou uma diminuição da viabilidade das células.

Figura 6 - Citotoxicidade do HV e HVA de atum contra fibroblastos de camundongo (L-929)



Fonte: elaborado pela autora

A partir deste ponto do trabalho, devido à equivalência estatística entre as amostras de HV e HVA apresentada no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, à similaridade qualitativa observada na SDS-PAGE e à praticidade de trabalhar com a extração do HVA, os processos nos quais o humor vítreo de atum é mencionado devem ser considerados de forma equivalente ao HVA.

4.3 Preparo do aerogel de CB-AL com e sem HV

As matrizes poliméricas foram produzidas tendo como objetivo principal a utilização para reparação tecidual. A utilização do protocolo de modificação da produção das blendas baseado no protocolo de Kirdponpattara *et al.* (2015) foi feita com a intenção de aumentar a estrutura porosa das matrizes de CB-AL que demonstravam, por sua vez, bons resultados de citocompatibilidade na pesquisa de Vasconcelos *et al.* (2020), já que o aumento da porosidade da matriz ocorre devido à modificação do processo de reticulação e liofilização das membranas formadas. Além da modificação física, foram adicionadas as proteínas da amostra de HV/HVA de atum, a 1 mg/mL, nas blendas, com o intuito de aumentar a biocompatibilidade e estimular as possíveis capacidades reparadoras do material.

Então, foram avaliados os parâmetros físico-químicos e biológicos do novo biomaterial para sua caracterização. Inicialmente, foi avaliada a influência das metodologias de produção das matrizes, às quais M1 designa a metodologia presente no estudo de Vasconcelos *et al.* (2020) e M2 a nova metodologia baseada no aumento da porosidade das matrizes e na obtenção de um aerogel, de acordo com Kirdponpattara *et al.* (2015). Além disso, foi aplicada uma variação na concentração de alginato de sódio nas blendas a fim de avaliar a melhor concentração de trabalho para reforço das matrizes (Tabela 4).

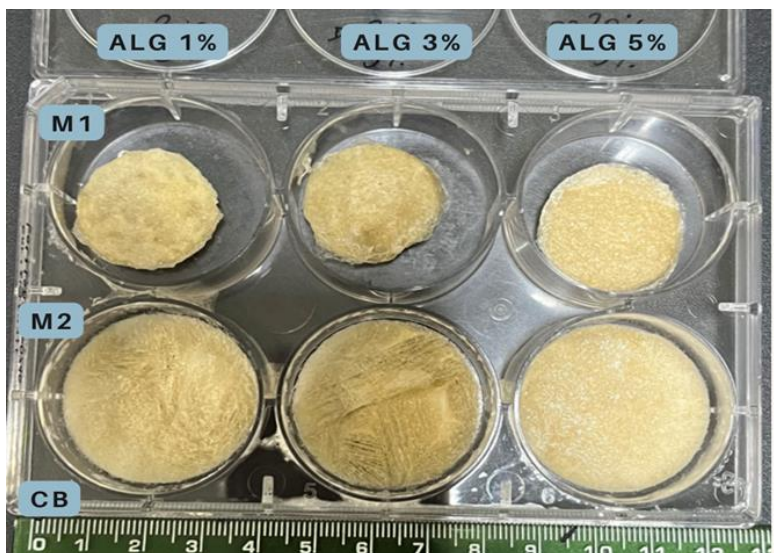
Tabela 4 - Desenho experimental da formulação dos aerogéis de CB-AL com e sem HV

Alginato (%)	CB (%)	Proteínas do HV (mg/mL)	Método de produção
2	25	1	M1
3	25	1	M1
5	25	1	M1
2	25	1	M2
3	25	1	M2
5	25	1	M2

Fonte: elaborado pela autora

Durante o processo de reticulação e liofilização, as matrizes produzidas pela metodologia M1 contraíram mais e apresentaram menor volume final que as matrizes produzidas pela M2 (Figura 7). Macroscopicamente, os aerogéis (M2) possuíam maior quantidade de poros e canais superficiais e internos, visíveis a olho, nu quando comparados com seus pares produzidos por M1. Essa característica gera um aspecto esponjoso nos aerogéis (M2), quando úmidos, e provoca uma resistência à pressão, quando liofilizados. Os aerogéis úmidos, quando submetidos à pressão, retomam a forma anterior sem aparente deformação e, quando cortados, permanecem na forma que são dados.

Figura 7 - Aerogéis de humor vítreo, alginato e celulose bacteriana



Fonte: elaborado pela autora.

Ademais, a variação na concentração de alginato de sódio gerou um aumento tanto na viscosidade, quando as blendas estavam sendo produzidas, quanto na firmeza, quando as matrizes estavam prontas. A “homogeneidade” na aparência superficial dos aerogéis também sofreu um aumento proporcional à concentração de alginato na blenda inicial. Em termos práticos de trabalho, as blendas com 2% mostraram-se mais fáceis de se manusear devido à baixa viscosidade e alta solubilização dos seus componentes, tornando o processo de produção mais ágil.

Com a adição do bioativo proteico às blendas, foi avaliada a possível interferência desse composto no processo de reticulação e formação das matrizes. Então, os testes foram repetidos com a adição das proteínas do HV de atum, 1mg/mL, às matrizes (Figura 8) e o resultado não demonstrou interferência no processo de reticulação pelas duas metodologias (M1 e M2), assim como não demonstrou interferir nas macroestruturas das membranas.

Figura 8 - Matrizes de CB-AL-HV e CB-AL



Fonte: elaborado pela autora.

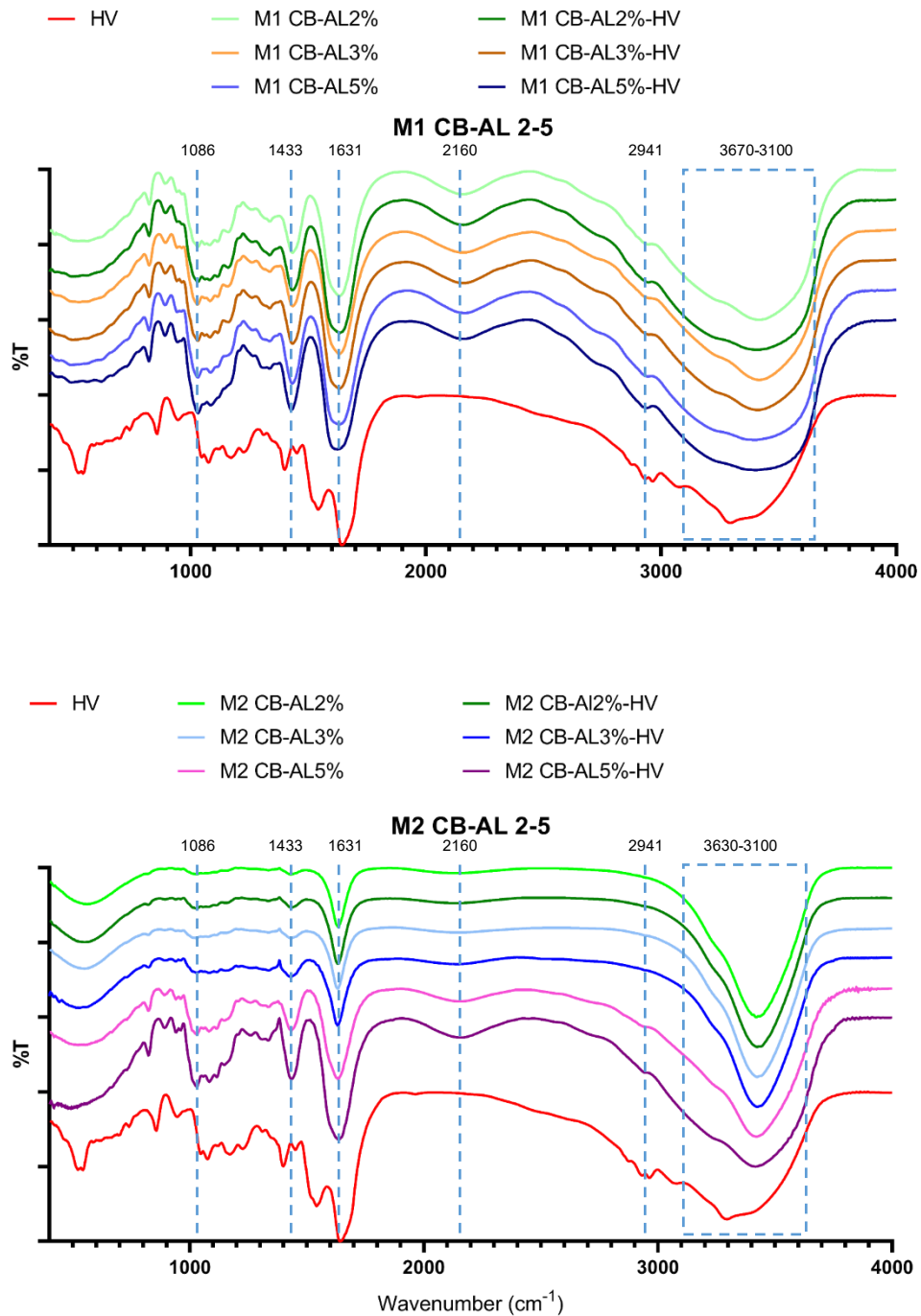
4.4 Avaliação de FTIR

A análise de FTIR é utilizada para avaliar as ligações químicas através dos espectros vibracionais do infravermelho. As bandas vibracionais que representam as amostras são características e inerentes da composição de cada uma e mostram a forma como os componentes estão interagindo quimicamente entre si (Tomoda *et al.*, 2020).

A banda vibracional que aparece entre 3670 e 3100 cm^{-1} , que representa o estiramento do grupo hidroxila (O–H), estava presente em todas as amostras, devido à estrutura química celulósica dos polímeros estudados. Além disso, as membranas apresentaram bandas vibracionais próximas às faixas de 2940 e 2900 cm^{-1} , o que é comum entre os polímeros e está relacionado aos estiramentos do CH_2 (metileno) assimétrico, na faixa próxima a 2940 cm^{-1} , e do CH_2 simétrico, na faixa próxima a 2900 cm^{-1} . Além disso, a banda próxima à faixa de 1631 cm^{-1} se apresentou bastante intensa e representa o estiramento $\text{C}=\text{O}$ (carbonila), referente ao grupo éster presente na composição da amostra. Já o pico próximo à faixa de 1050 cm^{-1} representa o estiramento da ligação simples $\text{C}-\text{O}$. Por último, foi possível observar a presença da banda próxima à faixa de 1435 cm^{-1} , que representa a deformação angular de CH_2 (Nandiyanto; Oktiani; Ragadhita, 2019). A Figura 9 demonstra

com mais detalhes o gráfico de FTIR das amostras de CB-AL produzidas pelas metodologias M1 e M2.

Figura 9 - Gráfico de FTIR das amostras de CB-AL produzidas pelas metodologias M1 e M2



Fonte: elaborado pela autora.

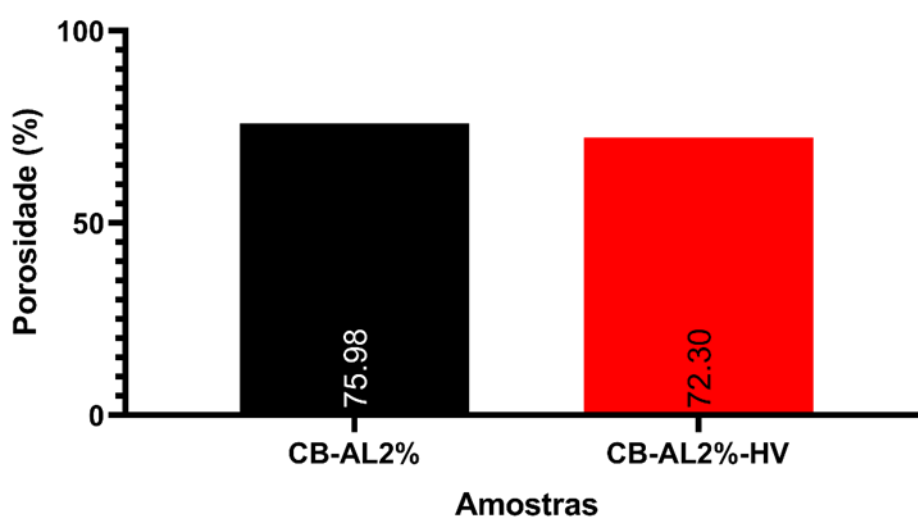
A partir destes dados de FTIR, foi possível avaliar os impactos das metodologias testadas na composição e interação dos materiais das blendas formuladas. Na avaliação das regiões de *fingerprint* ($1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) é possível observar que, para metodologia M1, não houve modificação no perfil de bandas, já para M2, houve modificação. Em M2, CB-AL2 e CB-AL3 apresentaram padrões diferentes de CB-AL5, que, por sua vez, apresentou padrões similares às bandas de M1. A presença das proteínas de HV não interferiu nos padrões de bandas do FTIR, indicando que os componentes da blenda provavelmente não interagiram quimicamente e houve somente uma dispersão e imobilização física.

Dessa forma, levando em consideração os dados obtidos até esse ponto do trabalho, foi decidido trabalhar somente com a matriz CB-AL2 e CB-AL2-HV.

4.5 Porosidade do biomaterial

Outro aspecto avaliado foi a porosidade do material comparada ao volume total dos poros. A adição da proteína do HV não alterou a porosidade do material (Figura 10). Contudo, a porosidade dos aerogéis de CB-AL2 e CB-AL2-HV, comparada ao estudo de Vasconcelos *et al.* (2020), se apresentou maior, com resultados entre 34,2% e 57,4%.

Figura 10 - Porosidade das matrizes de CB-AL2



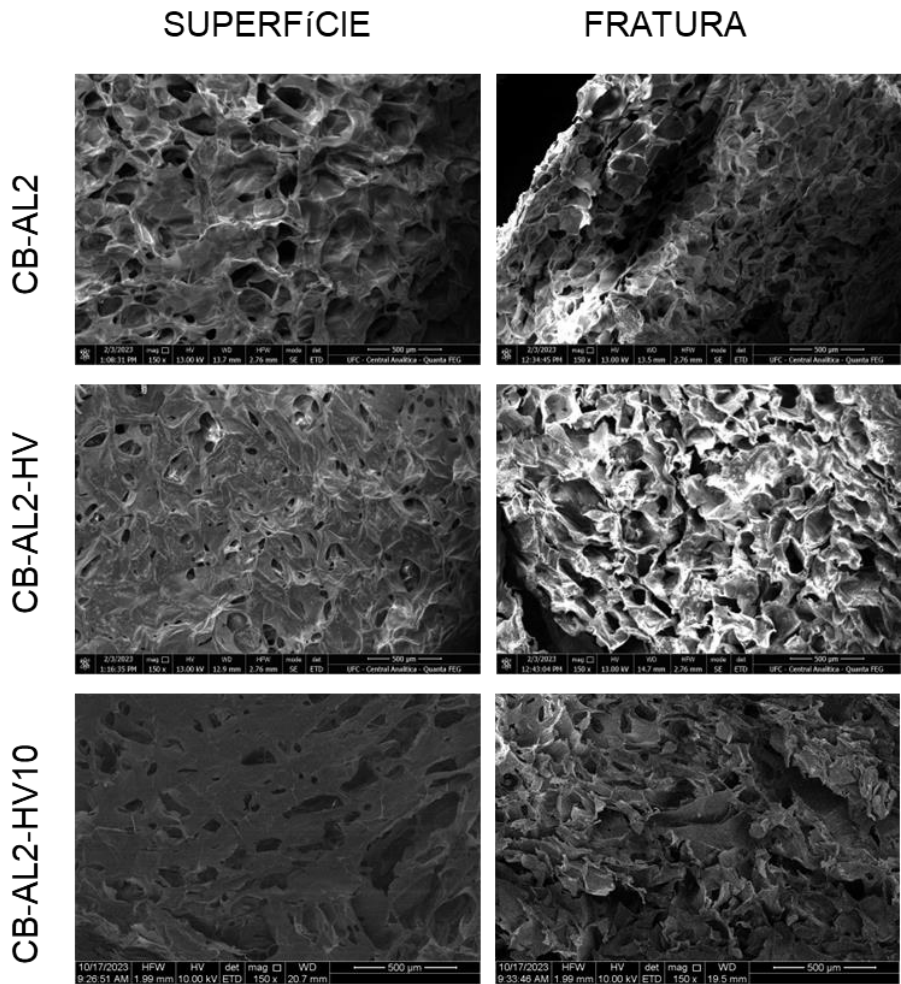
Fonte: elaborado pela autora.

4.6 Análise de MEV

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada como ferramenta para a avaliação da microestrutura porosa das matrizes formuladas e para a verificação de possíveis mudanças, a nível microscópico, na reticulação ou na porosidade, em consequência da adição de HV nas blendas.

Após a análise, foi possível observar estruturas porosas tanto na superfície quanto no interior das matrizes (Figura 11). A adição das proteínas de HV modificaram o tamanho dos poros superficiais, porém não modificaram o tamanho dos poros internos. Dessa forma, foi obtido um material bastante poroso conectado com o meio externo e com seu interior através da sua estrutura porosa interligada.

Figura 11 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície e da fratura lateral dos diferentes aerogéis formulados



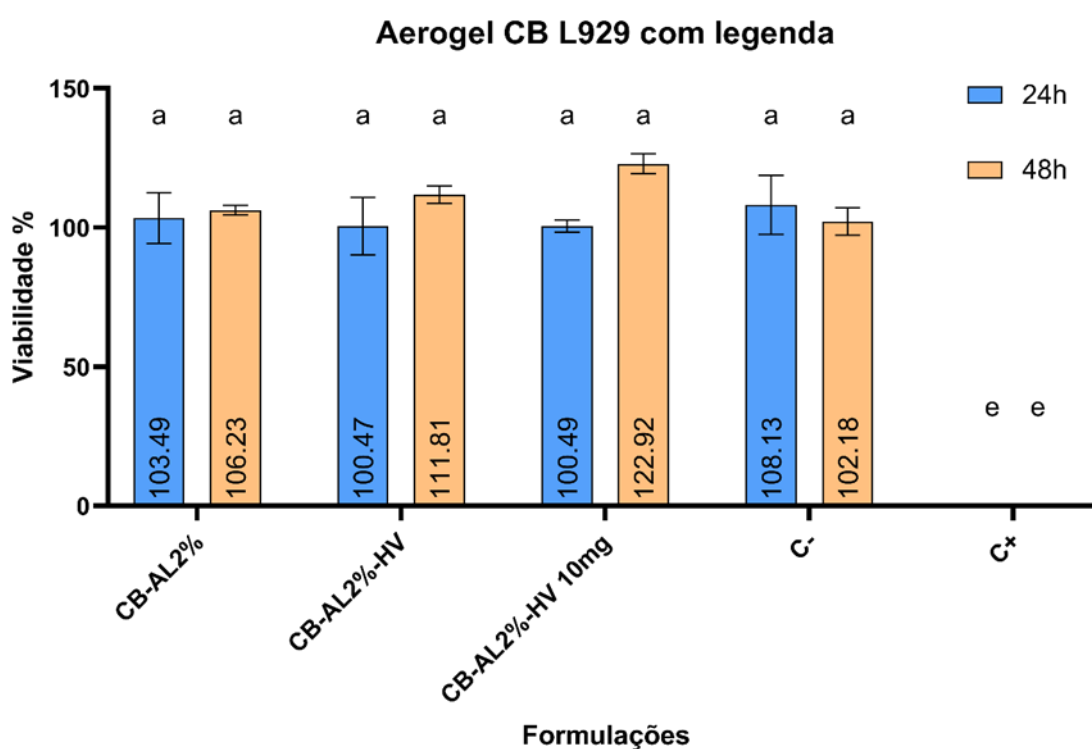
Fonte: elaborado pela autora.

4.7 Citotoxicidade do biomaterial

Para avaliar o potencial de compatibilidade biológica inicial das matrizes produzidas, foi realizado, novamente, o ensaio de citotoxicidade contra células L-929, com as formulações finais e com uma nova formulação contendo 10 mg/mL de HV de atum. Este ensaio foi realizado para investigar se o aumento da liberação do HV geraria melhores resultados do que os obtidos até o momento.

Apesar da amostra de CB-AL2%-HV (10 mg) ter apresentado um valor de viabilidade maior que as outras amostras no tempo de 48 h, a avaliação estatística não demonstrou diferença significativa entre as amostras, indicando que todas as três formulações não apresentaram citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem de células epiteliais testada (Figura 12). Esse resultado, quando comparado ao estudo de Kirdponpattara *et al.* (2015), apresenta similaridade contra a mesma linhagem de células sem o uso de bioativos.

Figura 12 - Citotoxicidade indireta contra fibroblastos de camundongo (L-929) *in vitro*



Fonte: elaborado pela autora.

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento e aprimoramento de processos laboratoriais são cruciais para garantir a eficácia e a replicabilidade de estudos científicos. Neste contexto, uma série de procedimentos relacionados ao humor vítreo (HV) de atum foi submetida a testes e validações, destacando-se pela eficiência e sucesso de reprodução.

Em primeiro lugar, a validação das etapas de coleta, processamento e armazenamento do HV demonstrou ser um marco crucial no estabelecimento de um protocolo confiável. Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível atestar a eficácia dos procedimentos de processamento dos olhos de atum, desde a coleta na indústria até a obtenção do HV, como sendo uma nova metodologia rápida e sem comprometimento da qualidade do *pool* proteico presente nos tecidos biológicos.

No que se refere à padronização do processo de extração de proteínas do HV, os resultados obtidos representaram um avanço significativo. A uniformização desse procedimento foi um sucesso e não apenas simplificou a execução, mas também assegurou a obtenção de resultados consistentes, fundamentais para a confiabilidade dos dados obtidos.

Quanto à caracterização biológica do HV, este procedimento foi realizado com sucesso, proporcionando uma compreensão importante das propriedades biológicas e bioquímicas desse tecido biológico. Esse passo se mostrou essencial para direcionar pesquisas subsequentes e explorar aplicações potenciais em diversas áreas da medicina.

Com respeito ao desenvolvimento do novo aerogel à base de celulose bacteriana funcionalizado com o HV, esse biomaterial revelou-se como uma inovação notável. A combinação desses elementos resultou em um material com propriedades únicas, abrindo possibilidades para aplicações inovadoras em diversos campos da medicina regenerativa.

Finalmente, a caracterização físico-química do aerogel formulado forneceu uma avaliação interessante das propriedades desse material. Aspectos como a citotoxicidade, porosidade e composição química foram minuciosamente examinados, consolidando a eficácia do processo de formulação.

Assim, cada etapa desse estudo, desde a coleta do HV até a caracterização do aerogel, foi conduzida com êxito, evidenciando a eficácia dos processos implementados. Os resultados sugerem que o material apresenta possibilidades promissoras para prosseguir com pesquisas e estudos sobre sua aplicação como componente em terapias avançadas destinadas ao reparo tecidual. Para avançar, é essencial submetê-lo a avaliações adicionais com diversas

linhagens de células e à análise de testes com animais, uma vez que a pele, sendo um tecido de dinâmica complexa, só pode ser completamente compreendido em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Enas M. **Hydrogel: preparation, characterization, and applications**. Journal of Advanced Research, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 105-121, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- ANTONYUK, S. *et al.* **Influence of coating and wetting on the mechanical behaviour of highly porous cylindrical aerogel particles**. Powder Technology, [S. L.], 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591015003708>.
- AEGERTER, M.; LEVENTIS, N.; KOEBEL, M. **Aerogels handbook (Advances in Sol-Gel Derived Materials and Technologies)**. [S.L.]. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4419-75898.pdf%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=3FXWzJFOlnAC&oi=fnd&pg=P2&dq=Aerogels+Handbook&ots=MbUN5K6W9d&sig=5wg6moGTmfyVqBaD9YiAgvtub6I>.
- BENDAHO, D. *et al.* **Nano-fibrillated cellulose-zeolites based new hybrid composites aerogels with super thermal insulating properties**. Industrial Crops and Products, [S. L.], v. 65, p. 374–382, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014006992>.
- BERNARDO, Marcela *et al.* **Processamento e Aplicação de Biomateriais Poliméricos: avanços recentes e perspectivas**. Química Nova, [S.L.], p. 1311-1327, 2021. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170781>.
- BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J.; YARMUSH, Martin L. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine: history, progress, and challenges**. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 403-430, 15 jul. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>.
- BHATIA, Sujata K. **Biomaterials for Clinical Applications**. Nova Iorque: Springer Science, 2010.
- BIOMATERIAL PARA IMPLANTES OCULARES: Tecnologia adere melhor ao tecido do paciente, reduzindo risco de deslocamento do implante. São Paulo, 30 out. 2018. Disponível em: <https://www2.unesp.br/portal#!/jornal/edicoes/2018/347/noticias/biomaterial-para-implantes-oculares/>. Acesso em: 30 out. 2023.
- BIRBRAIR, Alexander; FRENETTE, Paul S. **Niche heterogeneity in the bone marrow**. Annals Of The New York Academy Of Sciences, [S.L.], v. 1370, n. 1, p. 82-96, 25 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13016>.
- CATOIRA, Marta Calvo *et al.* **Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications**. Journal Of Materials Science: Materials in Medicine, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 115, out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.

DAS, Subhamoy; BAKER, Aaron B. **Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [S.L.], v. 4, p. 1-20, 31 out. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2016.00082>.

DE MARCO, I. *et al.* **Supercritical gel drying for the production of starch aerogels for delivery systems**. *Chemical Engineering Transactions*, [S. L.], v. 43, p. 307 – 312, 2015.

DERVIN, S.; PILLAI, S. C. **An Introduction to Sol-Gel Processing for Aerogels**. *Materials and Technologies*, p. 1 – 22. 2017.

DOGENSKI, Mirelle. **Aerogéis à base de amido: síntese, caracterização e potenciais aplicações**. 2019. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

DUCHEYNE, Paul *et al.* **Comprehensive Biomaterials**. Reino Unido: Elsevier, 604 p. 2011.

DZOBO, Kevin *et al.* **Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: innovation and transformation of medicine**. *Stem Cells International*, [S.L.], v. 2018, p. 1-24, 30 jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2495848>.

FURTADO, Meison *et al.* **Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery**. *Engineered Regeneration*, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 217-231, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.engreg.2022.05.002>.

GOMES, Kátia Maria Sampaio *et al.* **Induced pluripotent stem cells reprogramming: epigenetics and applications in the regenerative medicine**. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 180-189, fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.63.02.180>.

GOTO, Aline Yoshie. **Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e demekin**. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

HESTRIN, Schramm; SCHRAMM, M. J. B. J. **Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose**. *Biochemical Journal*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>.

HAMED, Imen *et al.* **Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: a review**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 446-465, 5 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12136>.

KARTHIKEYAN, Akash; JOSEPH, Abey; NAIR, Baiju G. **Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases**. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-38, 26 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s43141-021-00290-4>.

KIRDPONPATTARA, Suchata *et al.* **Structural modification and characterization of bacterial cellulose–alginate composite scaffolds for tissue engineering**. *Carbohydrate polymers*, v. 132, p. 146-155, 2015.

KISTLER, S. S. **Coherent Expanded-Aerogels**. J. Phys. Chem., [S.L.], v. 36, n. 1, p. 52 – 64, 1932. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150331a003>.

KRAMER, Dany Geraldo; DOS SANTOS MACEDO, Amanda Rayla; DE MOURA, Ana Maria Marinho Andrade. **A Importância dos Hidrogéis na Pesquisas Antimicrobiana: Revisão de Literatura**. Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc São Miguel do Oeste, v. 5, p. e26554-e26554, 2020.

KLEINBERG, Teri T. *et al.* **Vitreous Substitutes: a comprehensive review**. Survey of Ophthalmology, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 300-323, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2010.09.001>.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. Nature, [S.L.], v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

LI, Rongni *et al.* **Study on Physiological and Biochemical Index of Blood and Vitreous Humor in the Celestial Goldfish (Carassius auratus)**. 2023. <http://dx.doi.org/10.20944/preprints202309.1866.v1>

LIONETTO, Francesca; CORCIONE, Carola Esposito. **Recent Applications of Biopolymers Derived from Fish Industry Waste in Food Packaging**. Polymers, [S.L.], v. 13, n. 14, p. 2337, 16 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym13142337>.

LIU, Xinyue *et al.* **Hydrogel machines**. Materials Today, [S.L.], v. 36, p. 102-124, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2019.12.026>.

MURALI, Karthik *et al.* **Whole Vitreous Humor Dissection for Vitreodynamic Analysis**. Journal of Visualized Experiments, [S.L.], n. 99, p. 1-7, 24 maio 2015. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/52759>.

MACEDO, Maria Wanna Figueiredo Sena *et al.* **Marine Organisms as a Rich Source of Biologically Active Peptides**. Frontiers in Marine Science, [S.L.], v. 8, p. 1-23, 15 jul. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2021.667764>.

MERQUIOL *et al.* **Biotechnological Applications of Scyphomedusae**. Marine Drugs, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 604, 24 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md17110604>.

MAZROUEI-SEBDANI, Zahra *et al.* **A review on silica aerogel-based materials for acoustic applications**. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 562, p. 120770, 2021.

MOGHADASI, Kaveh *et al.* **A review on biomedical implant materials and the effect of friction stir based techniques on their mechanical and tribological properties**. Journal of Materials Research and Technology, [S.L.], v. 17, p. 1054-1121, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.01.050>.

MALEKI, Hajar. **Recent advances in aerogels for environmental remediation applications: A review**. Chemical Engineering Journal, v. 300, p. 98-118, 2016.

- NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, R.; RAGADHITA, R. **How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material**. Indonesian Journal of Science and Technology, v. 4, n. 1, p. 97, 7 mar. 2019.
- NICOLAÏ, Marie. **Biomateriais em oftalmologia**. 2018. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.
- NAKAHARA, Vitor Poli. **Aerogéis de Celulose: uma revisão com enfoque nas oportunidades tecnológicas de produção e aplicação**. 2023. 33 f. Monografia. Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2023.
- OLEKSY, Małgorzata; DYNAROWICZ, Klaudia; AEBISHER, David. **Advances in Biodegradable Polymers and Biomaterials for Medical Applications—A Review**. Molecules, [S.L.], v. 28, n. 17, p. 6213, 24 ago. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28176213>.
- PATEL, Nitesh R.; GOHIL, Piyush P. **A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance**. Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng, v. 2, n. 4, p. 91-101, 2012.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. São Paulo, Nobel, 1987. 466p.
- PARIDA, Patitapabana; BEHERA, Ajit; MISHRA, Subash Chandra. **Classification of Biomaterials used in Medicine**. International Journal of Advances in Applied Sciences, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 125-129, 1 set. 2012. Institute of Advanced Engineering and Science. <http://dx.doi.org/10.11591/ijaas.v1i3.882>.
- PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M. **Biomaterials: types, applications, and market**. Química Nova, [S.L.], p. 957-971, maio 2015. GN1 Sistemas e Publicações Ltd. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.
- RAJABIMASHHADI, Zahra *et al.* **Collagen Derived from Fish Industry Waste: progresses and challenges**. Polymers, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 544, 20 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym15030544>.
- REICH, Michael *et al.* **Proteomic analysis of vitreous humor in retinal vein occlusion**. PLoS One, v. 11, n. 6, p. e0158001, 2016.
- RIGOGLIUSO, Salvatrice *et al.* **Recovery of Bioactive Compounds from Marine Organisms: focus on the future perspectives for pharmacological, biomedical and regenerative medicine applications of marine collagen**. Molecules, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 1152, 24 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031152>.
- ROMERO, Guilherme Carnielli; TRINDADE, Jéssica Andrade. **Aspectos da Interação Biomaterial-Tecido: Uma Revisão**. Trabalho de Graduação em Engenharia Biomédica. Universidade Federal do ABC. São Bernardo do Campo, SP, 2018.
- RATNER, Buddy D. **Biomaterials: been there, done that, and evolving into the future**. Annual review of biomedical engineering, v. 21, p. 171-191, 2019.

REDE NACIONAL DE TERAPIA CELULAR. O que são células-tronco? Disponível em: <http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html#:~:text=O%20que%20s%C3%A3o%20as%20c%C3%A9lulas,5%20dias%20ap%C3%B3s%20a%20fecunda%C3%A7%C3%A3o>). Acesso em: 24 outubro 2023.

SEBAG, J. **The Vitreous: structure, function, and pathobiology**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1989. 173 p.

SMIRNOVA, Irina; GURIKOV, Pavel. **Aerogels in chemical engineering: Strategies toward tailor-made aerogels**. Annual review of chemical and biomolecular engineering, v. 8, p. 307-334, 2017.

SOUZA, Verônica Ferreira de *et al.* **Células-tronco: uma breve revisão**. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 251-256, 1 jan. 2003. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v2i2.4292>.

SU, Xin; WANG, Ting; GUO, Shu. **Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field**. Regenerative Therapy, [S.L.], v. 16, p. 63-72, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.007>.

TERZIC, Andre *et al.* **Regenerative Medicine Build-Out. Stem Cells Translational Medicine**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 1373-1379, 4 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2015-0275>.

TOMODA, Bruno Thorihara *et al.* **Characterization of biopolymer membranes and films: Physicochemical, mechanical, barrier, and biological properties**. In: Biopolymer membranes and films. Elsevier, p. 67-95. 2020.

TROY, Eoin *et al.* **Nature-Based Biomaterials and Their Application in Biomedicine**. Polymers, [S.L.], v. 13, n. 19, p. 3321, 28 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym13193321>.

VASCONCELOS, Grazielly Maria Didier de *et al.* **Produção e caracterização de celulose pela Glucanoacetobacter hansenii em meio contendo glicose ou manitol**. Matéria (Rio de Janeiro), v. 25, p. e-12844, 2020.

VON SALLMANN, LUDWIG; MOORE, DAN H. **Electrophoretic patterns of concentrated aqueous humor of rabbit, cattle and horse**. Archives of Ophthalmology, v. 40, n. 3, p. 279-284, 1948.

WANGKHEIRAKPAM, M. R. *et al.* **Fish waste utilization with reference to fish protein hydrolisate-A review**. Fishery Technology, v. 56, n. 3, p. 169-178, 2019.

WILLIAMS, David F. **On the nature of biomaterials**. Biomaterials, [S.L.], v. 30, n. 30, p. 5897-5909, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>.

WYLES, Saranya P *et al.* **Emerging workforce readiness in regenerative healthcare.** Regenerative Medicine, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 197-206, mar. 2021. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/rme-2020-0137>.

YU, Yunru *et al.* **Living Materials for Regenerative Medicine.** Engineered Regeneration, Shanghai, v. 2, p. 96-104, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.engreg.2021.08.003>.

ZENG, Xianfang; RUCKENSTEIN, Eli. **Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes.** Industrial & Engineering chemistry research, v. 35, n. 11, p. 4169-4175, 1996.