

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE - CCTS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

JULIANA RAFAEL DE MORAES

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E FOTORRETICULAÇÃO DO COLÁGENO DA
PELE DE TILÁPIA VISANDO APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Sorocaba - SP

2025

JULIANA RAFAEL DE MORAES

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA E SUA
FOTORRETICULAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos, *Campus Sorocaba* para obtenção do título de mestre em ciência dos materiais.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Komatsu

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAPES

Sorocaba - SP

2025

Moraes., Juliana Rafael de

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO DA
PELE DE TILÁPIA E SUA FOTORRETICULAÇÃO PARA
APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL / Juliana
Rafael de Moraes. -- 2025.
73f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca Examinadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida de

Rezende Duek, Profa. Dra. Kelly Roberta Francisco

Muruci de Paula, Prof. Dr. Ariana de Souza Moraes dos
Santos

Bibliografia

1. Colágeno. 2. Fotorreticulação. 3. Riboflavina. I.
Moraes., Juliana Rafael de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS



Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Juliana Rafael de Moraes, realizada em 28/02/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek (PUC/SP)

Profa. Dra. Kelly Roberta Francisco Muruci de Paula (UFSCar)

Prof. Dr. Ariana de Souza Moraes dos Santos (PUC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

Ao meu doce avô Estelintro, por todo amor e dedicação (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

Agradeço à minha família pelo apoio e suporte. Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos, que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis, oferecendo não apenas suporte, mas também palavras de incentivo que me impulsionaram a seguir em frente.

Expresso minha gratidão à minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Eliana Aparecida de Rezende Duek, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Daniel Komatsu, por compartilharem seu vasto conhecimento, por sua orientação precisa e pelo constante suporte durante essa jornada acadêmica. Suas contribuições foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biomateriais da PUC Sorocaba, agradeço pela motivação contínua, pelos valiosos ensinamentos, pelas risadas que tornaram o caminho mais leve, e pelos momentos compartilhados ao redor de uma boa xícara de café. Nossa convivência foi um dos pontos altos dessa experiência.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Universidade Federal de São Carlos Campus Sorocaba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, por me proporcionarem um ambiente acadêmico estimulante e repleto de oportunidades. O suporte institucional, os recursos oferecidos e o compromisso com a excelência acadêmica foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Por fim, agradeço a Pontifícia Universidade Católica pela estrutura do laboratório e a agência de fomento CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

O colágeno, principal proteína estrutural da matriz extracelular de vertebrados, constitui mais de 25% das proteínas do corpo humano. Sua organização molecular em três cadeias polipeptídicas helicoidais confere resistência mecânica, estabilidade bioquímica e capacidade de estimular a proliferação celular. Devido a essas propriedades, o colágeno tem aplicações estratégicas em setores como biomedicina, engenharia tecidual, indústria alimentícia e farmacêutica. Tradicionalmente obtido de fontes bovinas e suínas, sua extração enfrenta desafios sanitários e restrições religiosas, motivando a busca por alternativas sustentáveis. Nesse contexto, o colágeno de origem aquática surge como uma opção promissora, não apenas por sua abundância e baixo risco zoonótico, mas também por aproveitar resíduos da aquicultura – que contêm entre 50% e 70% de colágeno, agregando valor econômico e reduzindo a dependência de importações. A extração por solubilização ácida é amplamente empregada por preservar a estrutura nativa da proteína. No entanto, o colágeno puro apresenta limitações em suas propriedades mecânicas, exigindo modificações como a reticulação para ampliar seu uso biomédico. Neste estudo, investigou-se a fotorreticulação mediada por riboflavina (vitamina B₂), um método que utiliza luz LED azul para formar hidrogéis com propriedades físico-químicas ainda pouco exploradas. O colágeno foi extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), submetido a caracterização por eletroforese (SDS-PAGE), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C). Posteriormente, hidrogéis foram sintetizados com riboflavina (0,1% e 1,0%) e irradiados por 5, 10, 20 e 30 minutos. As análises termogravimétricas (TGA) revelaram maior estabilidade térmica nos hidrogéis com tempos prolongados de reticulação, enquanto ensaios de intumescimento indicaram menor absorção hídrica e maior densidade de reticulação em de 1,0% de riboflavina e maior tempo de exposição à luz. A temperatura de desnaturação do colágeno reticulado (45°C) superou a do nativo (37°C), e testes de citotoxicidade em linhagens celulares confirmaram sua biocompatibilidade. Os resultados demonstram que o colágeno derivado de tilápia, quando fotorreticulado, apresenta características adequadas para aplicações em engenharia tecidual, destacando-se como uma alternativa viável e sustentável aos colágenos convencionais.

Palavras-chave: Biomateriais; Pele de tilápia; Colágeno; Fotorreticulação; Riboflavina.

ABSTRACT

Collagen, the main structural protein of the extracellular matrix in vertebrates, accounts for over 25% of total human body proteins. Its molecular organization into triple-helical polypeptide chains provides mechanical strength, biochemical stability, and the ability to stimulate cell proliferation. Due to these properties, collagen has strategic applications in biomedical, tissue engineering, food, and pharmaceutical industries. Traditionally sourced from bovine and porcine tissues, its extraction faces sanitary challenges and religious restrictions, driving the search for sustainable alternatives. In this context, aquatic-derived collagen emerges as a promising option, not only due to its abundance and low zoonotic risk but also because it utilizes aquaculture byproducts—which contain 50–70% collagen—adding economic value and reducing import dependency. Acid solubilization is widely employed for extraction as it preserves the protein's native structure. However, pure collagen exhibits limitations in mechanical properties, requiring modifications such as crosslinking to expand its biomedical use. This study investigated riboflavin (vitamin B₂)-mediated photocrosslinking, a method that uses blue LED light to form hydrogels with poorly explored physicochemical properties. Collagen was extracted from tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and characterized by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹³C NMR). Hydrogels were then synthesized with riboflavin (0.1% and 1.0%) and irradiated for 5, 10, 20 and 30 minutes. Thermogravimetric analysis (TGA) revealed higher thermal stability in hydrogels with prolonged crosslinking times, while swelling assays indicated lower water absorption and higher crosslinking density at increased riboflavin concentrations and longer light exposure. The denaturation temperature of crosslinked collagen (45°C) exceeded that of native collagen (37°C), and cytotoxicity tests confirmed its biocompatibility. These results demonstrate that photocrosslinked tilapia-derived collagen exhibits suitable properties for tissue engineering applications, positioning it as a viable and sustainable alternative to conventional collagens.

Keywords: Biomaterials; Tilapia skin; Collagen; Photo-crosslinking; Riboflavin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do colágeno. (a) Tripla hélice de colágeno (b) Estrutura primária - sequência de aminoácidos.	19
Figura 2 - Exemplo de ligações entre cadeias α da tripla hélice do colágeno	20
Figura 3 - Representação da sobreposição das fibrilas de colágeno dando origem às fibras. .	22
Figura 4 – Mapa das zonas com o maior volume de produção de tilápia no Brasil.	26
Figura 5 - Estrutura química da riboflavina	30
Figura 6 - Diagrama de Jablonski modificado. Processo fotofísico: 1) absorção; 2) fluorescência; 3) conversão interna; 4) cruzamento intersistemas; 5) fosforescência; 6) formação de radicais livres por transferência de energia do fotossensibilizador T1 para substratos biológicos; e 7) formação de oxigênio singlete (1O_2) por transferência de energia do fotossensibilizador T1 para oxigênio tripleto (3O_2).	32
Figura 7 – Fluxograma do processo de extração de colágeno da pele de tilápia.....	34
Figura 8 – Fluxograma da metodologia aplicada na reticulação fotoinduzida por solução de riboflavina nas concentrações de 0,1% e 1,0%, sob exposição à luz de LED azul por períodos de 5, 10, 20 e 30 minutos.....	34
Figura 9 - Fotografia da amostra de colágeno extraído (ColE) após o processo de liofilização.	41
Figura 10 – Análise SDS-PAGE do padrão de massa molar (A), amostra de colágeno extraído da pele de tilápia (B) e do colágeno tipo I bovino (C).	42
Figura 11 – Fotomicrografia por MEV da superfície do colágeno extraído da pele de tilápia.	43
Figura 12 - Espectros de FTIR das amostras de colágeno extraído da pele de tilápia (ColE), colágeno extraído da pele de tilápia fotorreticulado com solução 1,0% de riboflavina (ColR) por 30 min e colágeno tipo I bovino comercial.	44

Figura 13 - Espectro FTIR de amostras de colágeno reticulado com solução de riboflavina 1,0 % nos tempos de 5, 10, 20, 30 minutos de exposição à luz azul.	46
Figura 14 - Espectro de amostras de colágeno reticulado com solução de riboflavina 0,1% nos tempos de 30, 20, 10 e 5 minutos de exposição à luz azul.	47
Figura 15 - Espectro de RMN de sólido de ¹³ C das amostras de colágeno extraído da pele de tilápia (a) e colágeno comercial tipo I bovino (b).	48
Figura 16 – Espectro de RMN ¹³ C da amostra de colágeno no estado sólido extraído da pele de tilápia.	49
Figura 17 – Solução de colágeno extraído da pele de tilápia sem reticulação (A). Colágeno extraído reticulado por 30 minutos com solução 1,0% de riboflavina (B). Hidrogéis de colágeno reticulados com solução de riboflavina 0,1% nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos (C). Hidrogéis de colágeno reticulados com solução de riboflavina 1,0% nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos (D).....	50
Figura 18 - Taxa de intumescimento dos hidrogéis reticulados em diferentes tempos de exposição à luz azul, com solução de riboflavina de concentração (A)1,0% e (B) 0,1%.	52
Figura 19 - Curvas TG e DTG das amostras colágeno extraído da pele de tilápia, colágeno extraído reticulado com solução de riboflavina 1,0% por 30 minutos e Riboflavina.	54
Figura 20 - Curvas TG e DTG para as amostras de colágeno extraído da pele de tilápia e colágeno extraído fotorreticulado com com solução de riboflavina 1,0% por 20 minutos. ...	577
Figura 21 - Curvas de tan delta e viscosidade complexa em função da temperatura para soluções de colágeno. (a) colágeno extraído intumescido em água a 6 mg.ml ⁻¹ e (b) solução em HCl (0,01M) de colágeno extraído a 6 mg.ml ⁻¹	588
Figura 22 – Curva de tan delta e viscosidade complexa em função da temperatura para o colágeno fotorreticulado com riboflavina.....	599
Figura 23 – Gráfico de viabilidade celular do grupo colágeno extraído da pele de tilápia, ColR 0,1% 5 min, ColR 0,1% 20 min, ColR 1,0% 5 min, ColR 1,0% 20 min.....	611

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resíduos de aminoácidos em colágeno extraído de peixes, mamíferos e aves (Os dados são expressos como números de resíduos de aminoácidos/1000 resíduos de aminoácidos).....23
- Tabela 2** – Propriedades do colágeno extraído por diferentes métodos de extração25
- Tabela 3** – Valores de Tonset, Tmax e perda de massa (%) para as amostras de colágeno extraído da pele de tilápia, colágeno extraído reticulado com solução de riboflavina 0,1% e 1,0% em diferentes tempos e Riboflavina. 55
- Tabela 4** – Temperatura de desnaturação do colágeno reticulado com solução de riboflavina 0,1% e 1,0% em diferentes tempos de exposição a luz de azul..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala - Alanina

Arg - Arginina

Asp - Asparagina

CTL- - Controle negativo

CTL+ - Controle positivo

ColE - Colágeno extraído da pele de tilápia

ColR - Colágeno extraído fotorreticulado com riboflavina e luz de LED azul

Cys - Cisteína

EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

FTIR- ATR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada

Glu - Glutamina

Gly - Glicina

His - Histidina

Hyl - Hidroxilisina

Hyp - Hidroxiprolina

Ile - Isoleucina

Leu - Leucina

Lys - Lisina

Met - Metionina

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Phe - Fenilalanina

Pro - Prolina

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Ser – Serina

TEMED - Tetrametiletlenodiamina

TGA – Termogravimétrica

Thr – Treonina

Tyr - Tirosina

Val - Valina

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.1.1 Específicos.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO COLÁGENO.....	23
3.2 AQUICULTURA.....	25
3.3 RETICULAÇÃO DO COLÁGENO.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 FLUXOGRAMA.....	33
4.2 MATERIAIS.....	35
4.3 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO.....	35
4.3.1 Avaliação do Rendimento.....	36
4.3.2 Espectroscopia Na Região Do Infravermelho Com Transformada De Fourier Com Refletância Total Atenuada (FT-IR-ATR).....	36
4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.3.5. Ressonância magnética nuclear de ¹³ C (RMN de ¹³ C).....	38
4.4 RETICULAÇÃO DO HIDROGEL DE COLÁGENO.....	38
4.4.1 Teste de intumescimento.....	39
4.5 TERMOGRAVIMETRIA (TGA).....	39
4.6 ENSAIOS REOLÓGICOS.....	39
4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO.....	41
5.3 - SDS-PAGE.....	41

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	43
5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FT-IR- ATR)	44
5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier com refletância total atenuada (FT-IR-ATR) das amostras reticuladas com as soluções de 0,1% e 1,0% de riboflavina em diferentes tempos	46
5.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	47
5.4 RETICULAÇÃO DO COLÁGENO.....	49
5.4.1 Teste de intumescimento	51
5.5 TERMOGRAVIMETRIA.....	54
5.6 ENSAIOS REOLÓGICOS	57
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na engenharia tecidual e medicina regenerativa nas últimas décadas vêm revolucionando a forma como diversas condições médicas são tratadas. O desenvolvimento de biomateriais, aliado a novas tecnologias, tem permitido a substituição e reparo de partes do corpo danificadas (Zohorsky & Mequanint, 2021). Essas inovações têm o potencial de transformar significativamente o campo da saúde, oferecendo novas soluções para doenças crônicas, lesões traumáticas e deficiências congênitas, além de possibilitar o desenvolvimento de terapias mais personalizadas e eficazes (Guillén-Carvajal et al, 2023).

O conceito de biomaterial, em constante evolução desde sua definição seminal pela *European Society for Biomaterials Consensus Conference II*, engloba materiais projetados para interagir com sistemas biológicos com o propósito de diagnosticar, tratar, reparar ou substituir tecidos e funções orgânicas (Williams, 2009). Dentre as categorias de biomateriais — que incluem materiais sintéticos, aloplásticos, metálicos, cerâmicos e poliméricos — os de origem xenógena destacam-se por sua singular biocompatibilidade e capacidade de emular a arquitetura e a funcionalidade da matriz extracelular nativa (Leali & Merolli, 2009).

O colágeno é amplamente utilizado como biomaterial, destacando-se na engenharia tecidual devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e versatilidade estrutural. Embora tradicionalmente obtido de fontes bovinas e suínas, cuja similaridade estrutural com o colágeno humano e ampla disponibilidade industrial justificam seu uso histórico, a busca por alternativas sustentáveis tem direcionado o interesse científico para fontes aquáticas. O colágeno derivado de peixes, em particular, surge como uma solução estratégica, não apenas pela matéria-prima abundante proveniente de resíduos da aquicultura, mas também por mitigar riscos zoonóticos e contornar restrições religiosas associadas aos mamíferos terrestres (Rajabimashhadi et al., 2023). Essa transição para fontes aquáticas alinha-se ainda a pressões globais por cadeias produtivas mais sustentáveis, nas quais o aproveitamento de subprodutos industriais agrega valor econômico e reduz impactos ambientais (Rajabimashhadi et al., 2023).

A fonte de colágeno determina características específicas que influenciam diretamente suas aplicações biomédicas. O colágeno de fontes aquáticas, como peixes, possui massa molar e uma temperatura de desnaturação inferior em comparação ao colágeno bovino e suíno, o que pode limitar sua aplicação em determinadas áreas médicas devido à menor estabilidade térmica e mecânica. A reticulação se apresenta como um método eficaz para melhorar significativamente as propriedades mecânicas, aumentando a temperatura de desnaturação e

proporcionando maior estabilidade estrutural ao material (Sun et al., 2017). A indução de ligações cruzadas entre as cadeias de colágeno pode ocorrer devido a reticulação química ou física. Os procedimentos de reticulação química geralmente usam reagentes contendo grupos reativos que formam as ligações entre as cadeias laterais de aminoácidos de moléculas de proteínas adjacentes. Os agentes de reticulação frequentemente utilizados são aldeídos, isocianatos, haletos de alquila e arila, imidoésteres, carbodiimidas, maleimidas N-substituídas e compostos de acilação (Weadock et al, 1983).

Apesar de melhorar as propriedades mecânicas e térmicas do colágeno, os agentes reticulantes podem apresentar toxicidade, ocasionar lixiviação do material ou formar ligações cruzadas instáveis (Heo et al, 2016). A busca por agentes reticulantes eficientes e menos citotóxicos têm motivado as pesquisas das últimas décadas. A reticulação fotossensibilizada pela riboflavina é uma alternativa eficiente, muito empregada no reparo da córnea, que garante a formação de hidrogéis fortalecidos e que não apresentam citotoxicidade (Elmassry et al, 2021). No entanto, o estudo de estruturas mecânicas estáveis reticuladas pela riboflavina e suas propriedades bem como o mecanismo de reação ainda estão pouco discutidos na literatura (Heo et al, 2016). Portanto, a fim de explorar as técnicas de reticulação do colágeno de peixe e melhorar suas propriedades térmicas e mecânicas para aplicações médicas, o presente trabalho tem como objetivo extrair e caracterizar o colágeno da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e realizar a sua fotorreticulação com riboflavina para aplicações biomédicas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho teve como objetivo extrair, caracterizar e fotorreticular o colágeno derivado da pele de *Oreochromis niloticus* (tilápia) para desenvolvimento de um hidrogel fotorreticulado com propriedades otimizadas para aplicações em engenharia tecidual.

2.1.1 Específicos

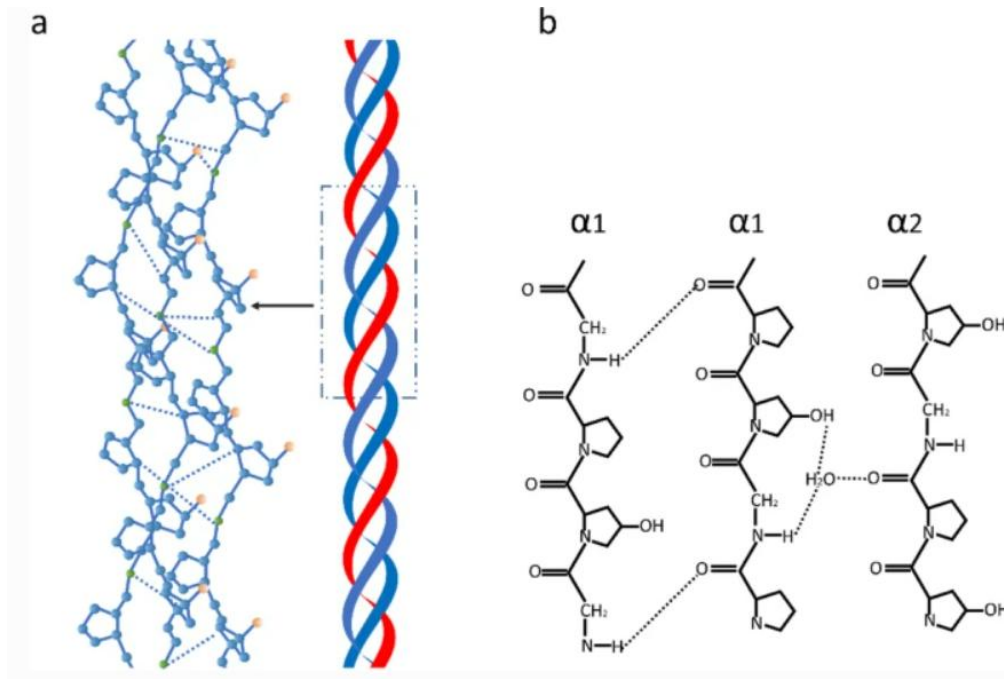
- Extrair o colágeno da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*).
- Caracterizar o produto da extração por Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FT-IR-ATR), Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), Termogravimetria (TG), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C RMN).
- Realizar análises de reologia para determinar a temperatura de desnaturação do colágeno extraído.
- Fotorreticular o colágeno extraído com solução de riboflavina e luz de LED azul em tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos.
- Caracterizar o hidrogel formado por FTIR, TG, teste de intumescimento e realizar análises reológicas para determinação da temperatura de desnaturação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, representando aproximadamente 30% do total de proteínas (Rýglová et al., 2017). Conhecido como a principal proteína estrutural da matriz extracelular, o colágeno desempenha um papel crucial não apenas na manutenção da integridade estrutural dos tecidos, mas também na estimulação e regulação de diversas funções celulares, incluindo diferenciação, mobilidade, comunicação e apoptose (Zheng et al., 2024). Encontrado na forma de fibrilas que compõem tecidos como pele, ossos, córnea, tendões e membrana basal, o colágeno é essencial para a resistência e elasticidade dos tecidos, além de ser fundamental nos processos de cicatrização e reparo tecidual (Frank-Kamenetskaya et al, 2020).

A estrutura primária do colágeno, também conhecida como tropocolágeno, é definida por três cadeias polipeptídicas formadas por uma sequência de resíduos de aminoácidos, caracterizada pela repetição do tripleto Gly-Xaa-Yaa ao longo de toda a extensão da cadeia. Neste tripleto, Gly é o aminoácido glicina, Xaa e Yaa podem ser substituídos por qualquer aminoácido, embora haja uma alta recorrência de o aminoácido prolina (Pro) ocupar a posição Xaa e hidroxiprolina (Hyp) ocupar a posição Yaa (Van Der Rest e Garrone, 1991). Esta composição da cadeia polipeptídica confere ao colágeno uma estrutura de tripla hélice, em que cada cadeia, denominada cadeia α , possui uma conformação espiral que se enrola no sentido levógiro. A união de três cadeias α forma a tripla hélice que se enrola no sentido destrógiro, com os resíduos de glicina localizados no centro da hélice e os resíduos dos aminoácidos nas posições Xaa e Yaa situados na superfície da hélice (Darvish, 2022). A figura 1 apresenta a estrutura química do colágeno.

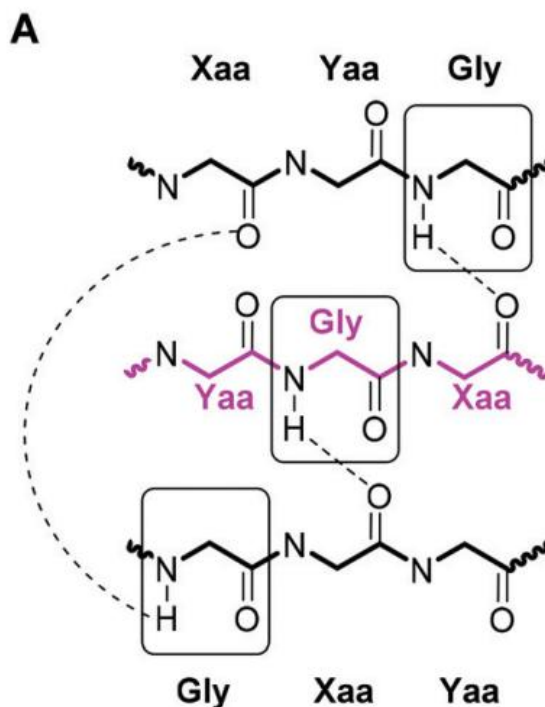
Figura 1 - Estrutura química do colágeno. (a) Tripla hélice de colágeno (b) Estrutura primária - sequência de aminoácidos.



Fonte: Zhang et al, 2020.

A composição de aminoácidos presentes ao longo da cadeia é em sua maioria aminoácidos ácidos, básicos e hidroxilados conferindo à molécula características hidrofílicas (Rýglová et al., 2017). A presença da glicina, no centro da tripla hélice, permite um empacotamento compacto e denso das cadeias polipeptídicas. A Pro e a Hyp, devido às suas estruturas rígidas, conferem resistência e estabilidade térmica. A hidroxiprolina é formada devido a hidroxilação da Pro, em uma modificação pós-traducional essencial para a estabilização da tripla hélice através da formação de ligações de hidrogênio adicionais (Rýglová et al., 2017). A tripla hélice pode ser composta por duas cadeias α idênticas e uma diferente, a depender do tipo de colágeno. As cadeias α que compõem a tripla hélice do colágeno não formam ligações de hidrogênio intramoleculares diretas, no caso do colágeno, as ligações de hidrogênio são formadas apenas entre as diferentes cadeias polipeptídicas (Figura 2), podendo ocorrer a formação de diferentes tipos de ligações como por exemplo a ligação de hidrogênio entre os grupos carbonila e amino de cadeias vizinhas $(Xaa)C = O \cdots H - N(\text{Gly})$ que ocorre uma vez para cada tripleto Gly-Xaa-Yaa, outro tipo de ligação ocorre na presença de água $(\text{Gly})C = O \cdots (\text{H}_2\text{O}) \cdots H - N(\text{Xaa})$, também ocorrem as ligações entre os grupos N-H, essas ligações são de extrema importância na formação e estabilização da estrutura helicoidal (Darvish, 2022).

Figura 2 - Exemplo de ligações entre cadeias α da tripla hélice do colágeno



Fonte: Kubyskin, 2019 com algumas modificações.

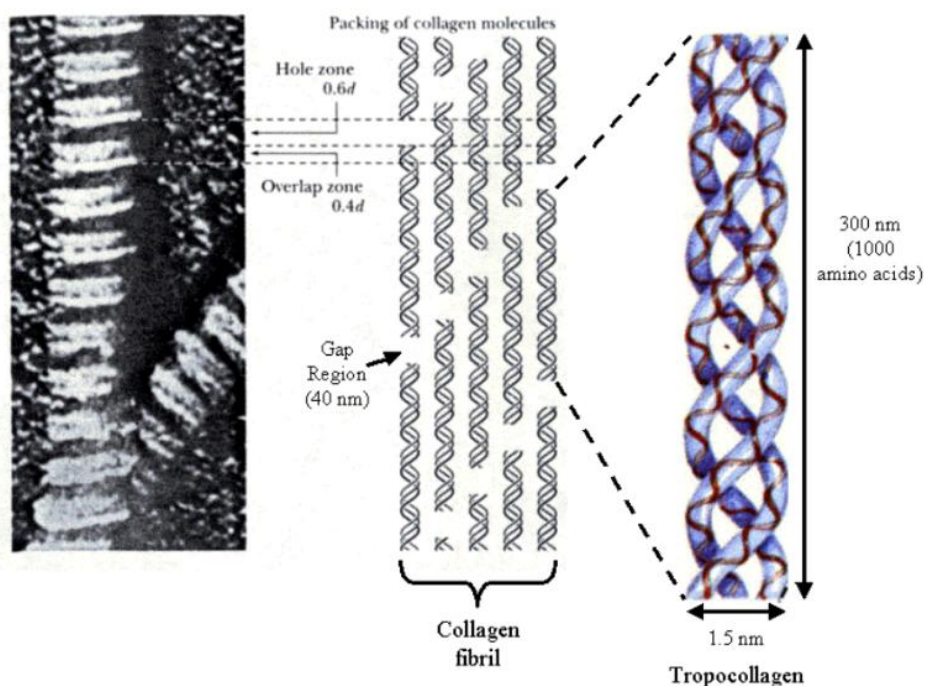
Até o momento foram descritos 28 tipos diferentes de colágenos (Subramanian et al, 2024). Os colágenos do tipo I, II, III, V e XI formam o grupo dos colágenos fibrilares que se caracterizam por possuírem a tripla hélice longa e contínua que organizam em fibrilas de elevada organização. Possuem alta resistência à tração e seu papel fundamental se encontra na estruturação do corpo como, por exemplo, pele, vasos sanguíneos e encapsulamento de órgãos. O colágeno tipo I é composto por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ [$\alpha 1(I)_2 - \alpha 2(I)$], estando presente em muitos órgãos, além de ser um dos principais constituintes dos ossos, tendões, ligamentos e da pele. O colágeno tipo V também faz parte de todos esses tecidos, mas com um papel mais secundário se comparado ao colágeno tipo I, atuando com uma rede de auxílio na formação do colágeno fibrilar dos tecidos (Mak et al, 2016). O colágeno tipo III é distribuído paralelamente ao colágeno tipo I, é abundantemente encontrado em tecidos distensíveis como, por exemplo, os vasos sanguíneos. O colágeno tipo II é um importante constituinte da cartilagem, bem como o colágeno tipo XI.

O colágeno tipo I é o tipo de colágeno mais abundante, representando cerca de 80% de todo o colágeno presente no corpo humano (Rýglová et al, 2017). Durante a biossíntese, o colágeno é secretado como pró-peptídeo e quando estão no espaço extracelular, as moléculas

maduras de colágeno vão sendo reunidas de forma espontânea, paralelamente uma à outra para formar as fibrilas. Esse movimento acontece devido à presença de aglomerados de aminoácidos hidrofóbicos na superfície da cadeia. O processo de formação das fibrilas, também chamado de fibrilogênese, pode ser comparado à cristalização, pois se assemelha ao crescimento nucleado, visto que uma pequena quantidade de moléculas forma um núcleo que cresce para formar as fibrilas. Nesse processo estão envolvidas muitas moléculas, entre elas, diferentes tipos de colágeno (colágeno tipo V, XI) e proteoglicanos como decorina, limicana, osteoglicina, queratocano (Darvish, 2022). Na fibrogênese, alguns resíduos de aminoácidos como lisil e hidroxilisil sofrem desaminação do grupo $\epsilon\text{-NH}_2$, pela lisina oxidase o que forma derivados de aldeído que se associaram com os grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ de outro resíduo lisil ou hidroxilisil de moléculas adjacentes formando as ligações cruzadas entre as cadeias. Em tecidos, as fibrilas se organizam de forma paralela uma à outra formando fibras como ocorre nos tendões ou podem se orientar de forma aleatória, dando origem a redes complexas como, por exemplo, a pele (Rossert; Crombrughe, 2002).

As fibrilas de colágeno organizam-se de maneira hierárquica, formando camadas sobrepostas que se estruturam em períodos bem definidos, conforme ilustrado na Figura 3. Esses períodos, denominados período D, apresentam um espaçamento característico de 67 nm entre as moléculas de colágeno adjacentes, o que resulta de uma organização molecular altamente ordenada. Cada período D contém aproximadamente 234 ± 1 resíduos de aminoácidos, que contribuem para a estabilidade e a funcionalidade da estrutura fibrilar. O padrão estriado observado nas fibrilas é uma consequência direta desse arranjo molecular periódico, no qual as unidades de colágeno se alinham de forma precisa. A tripla hélice de colágeno, com comprimento total de 300 nm, corresponde a 4,46 períodos D, evidenciando a repetitividade e a regularidade da estrutura (Tang et al., 2017). Essa organização molecular não apenas confere resistência mecânica às fibrilas, mas também desempenha um papel crucial na interação com outros componentes da matriz extracelular, influenciando propriedades biomecânicas e biológicas dos tecidos.

Figura 3 - Representação da sobreposição das fibrilas de colágeno dando origem às fibras.



Fonte: Brown, 2001.

A composição de aminoácidos que formam a cadeia de colágeno pode variar de acordo com o tipo de colágeno e sua fonte de extração. Essa variação influencia diretamente a capacidade de reticulação do colágeno e suas propriedades mecânicas. As cadeias laterais de aminoácidos, como Lys, Hyl, Pro e Hyp, desempenham um papel crucial nas ligações intra e intermoleculares. Conseqüentemente, quanto maior a quantidade desses aminoácidos presentes na cadeia, maior será a resistência do colágeno à degradação térmica e enzimática (Rýglóvá et al, 2017). A Pro, conforme discutido anteriormente, é capaz de formar ligações tanto com o grupo amino quanto com o carbono α , resultando em uma estrutura cíclica nas cadeias. A Hyp é responsável pelas ligações de hidrogênio intramoleculares, o que aumenta a estabilidade e a integridade da tripla hélice. Os resíduos de Lys e Hyl são fundamentais para a reticulação intermolecular estável e apresentam regiões propícias para ligações com carboidratos. Esses aminoácidos são essenciais para a preservação das características biológicas, estabilidade térmica e durabilidade dos biomateriais à base de colágeno (Rýglóvá et al., 2017). A Tabela 1 apresenta a distribuição de resíduos de aminoácidos em colágeno extraído de peixes, mamíferos e aves.

Tabela 1 – Resíduos de aminoácidos em colágeno extraído de peixes, mamíferos e aves (Os dados são expressos como números de resíduos de aminoácidos/1000 resíduos de aminoácidos).

	Escama de peixe	Pele de tilápia	Pele de Carpa	Pele bovina	Pele suína	Pele de frango
Asp	49	45	49	40	35	51
Thr	21	25	24	11	12	20
Ser	38	35	35	2	2	29
Glu	77	71	76	18	10	77
Pro	110	132	114	50	52	128
Gly	306	354	332	412	397	386
Ala	117	123	118	147	153	133
Val	19	19	19	17	21	22
Met	12	10	14	12	10	7
Ile	12	9	10	27	28	13
Leu	24	23	22	37	43	27
Tyr	21	4	3	3	4	4
Phe	15	13	13	12	13	15
Lys	26	25	28	55	64	29
His	6	6	5	10	13	7
Arg	50	53	55	26	27	50
Cys	32			2	3	2
Hyp	89	50	76	129	125	
Hyl			7			
Pro + Hyp	199	182	190	179	177	
	1024	1000	1000	1010	1012	1000

Fonte: Rýglová et al., 2017; Song et al, 2021.

3.1 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO COLÁGENO

Na obtenção de biomateriais à base de colágeno, uma das etapas mais importantes é a seleção do método de extração a ser utilizado. Devido à sua baixa solubilidade e caráter estrutural (fibrilar), estabilizado por interações intermoleculares e ligações cruzadas, o colágeno necessita de tratamentos específicos para ser extraído (Rýglová et al., 2017). A escolha do melhor método depende do material de origem, visando remover todas as substâncias não colagênicas com o objetivo de isolar o colágeno como produto (Matinong et al., 2022). A complexidade da estrutura do colágeno, composta por três cadeias polipeptídicas entrelaçadas

em uma tripla hélice, confere a essa proteína propriedades mecânicas únicas, como resistência à tração e elasticidade. No entanto, essa mesma estrutura torna o colágeno resistente a processos convencionais de extração, exigindo abordagens que possam romper as ligações cruzadas e as interações não covalentes sem comprometer a integridade da molécula (Rýglová et al., 2017).

Os principais métodos utilizados são a extração ácida, alcalina e enzimática, cada uma impactando diretamente a estrutura do colágeno resultante. A extração por hidrólise ácida, método de extração escolhido para ser aplicado nesse trabalho, permite obter colágeno com estrutura molecular intacta, preservando os telopeptídeos e os grupos NH₂ laterais, o que facilita a automontagem das estruturas de colágeno e a formação das fibrilas (Darvish, 2022). A extração enzimática, por sua vez, proporciona maior seletividade na reação, maximizando tanto o rendimento quanto a pureza do colágeno extraído. As enzimas utilizadas podem ser de origem animal, como a pepsina; de origem vegetal, como a bromelaína; ou produzidas por microrganismos, como a colagenase (Matinong et al., 2022). A pepsina é frequentemente preferida devido à sua facilidade de separação do colágeno solubilizado em comparação com outras enzimas. Nesse método de extração, as enzimas hidrolisam os telopeptídeos, tornando o colágeno prontamente solúvel em solução ácida, reduz sua antigenicidade, mas dificulta a formação de fibrilas após a extração, o que torna os géis de colágeno formados a partir da extração enzimática pobres em propriedades mecânicas (Darvish, 2022; Pal, 2016).

A extração alcalina oferece um alto rendimento do colágeno extraído e mantém as propriedades de aderência biológica do material. No entanto esse método de extração ocasiona a clivagem dos telopeptídeos resultando em um colágeno incapaz de formar fibrilas nativas *in vitro* (Darvish, 2022). Além disso, esse método pode destruir aminoácidos como serina, cisteína, histidina e treonina dificultando a sua aplicação em engenharia tecidual (Anal et al., 2013). Um resumo dos diferentes métodos de extração de colágeno é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades do colágeno extraído por diferentes métodos de extração

	Extração ácida	Extração enzimática	Extração alcalina
Estrutura molecular	Intacta	Parte dos telopeptídeos clivados	Telopeptídeos clivados e destruição de alguns aminoácidos
Gelificação	Possível em qualquer concentração de colágeno	Possível apenas em alta concentração de colágeno	Possível em pH ácido, sem o aparecimento de fibrilas
Capacidade de formar fibrilas nativas	Sim	Sim, com menor grau de organização	Não
Adesão celular a substratos do colágeno extraído	Boa adesão	Boa adesão	Boa adesão

Fonte: Darvish, 2022.

3.2 AQUICULTURA

A fonte de extração do colágeno também influencia substancialmente suas propriedades, bem como sua aplicabilidade em engenharia tecidual. O colágeno extraído de animais aquáticos é cada vez mais empregado nos diferentes setores industriais devido à sua grande disponibilidade em resíduos gerados pelas práticas aquícolas e marinhas.

A aquicultura é uma prática que vem crescendo ao longo das décadas em todo o mundo, impulsionada pela grande demanda do mercado e pela maior procura da população por alimentos provenientes de ambientes aquáticos. A Ásia é o continente dominante na aquicultura mundial, produzindo 91,6% do total. No entanto, desde os anos 1960, a produção de peixes tem aumentado globalmente (FAO, 2022). O crescimento dos rendimentos e a urbanização, juntamente com melhorias nas práticas pós-colheita e mudanças nas tendências alimentares, são fatores que devem levar a um aumento de 15% no consumo de alimentos aquáticos e as estimativas para 2030 são que esse consumo atinja uma média de 21,4 kg per capita.

O Brasil está entre os dez maiores produtores de tilápia do mundo. Entre as diversas formas de cultivo aquícola no país, a tilápia destaca-se pelo volume produzido, o que se deve à

simplicidade tecnológica dessa prática e ao seu significativo impacto socioeconômico (Barroso et al, 2018). Desde 1990, o Brasil vem modernizando seu setor de aquicultura, implementando sistemas de cultivo mais sustentáveis, com maior produtividade, qualidade e eficiência na produção de peixes (Barroso et al., 2019). Nos últimos anos, a produção de tilápia no Brasil tem crescido de forma contínua, com uma taxa média de crescimento de 11% ao ano entre 2013 e 2020, alcançando um volume de 343.595 toneladas em 2020. A maior parte dessa produção é destinada ao consumo interno, com apenas 1,1% sendo exportada (Ribeiro et al, 2022). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) do inglês *Food and Agriculture Organization*, estima que, entre 2016 e 2030, a produção aquícola no Brasil terá um crescimento de aproximadamente 89%. As maiores zonas de produção de tilápia no país são a região do Submédio Baixo São Francisco, Oeste do Paraná, Boa Esperança e Serra da Mesa e Cana Brava como é possível observar no mapa da Figura 4.

Figura 4 – Mapa das zonas com o maior volume de produção de tilápia no Brasil.



Fonte: (Ribeiro et al 2022)

No Brasil, a tilápia tem como principal produto comercial o filé em que são usados em média 32% do peixe inteiro, isso significa que cerca de 68% do peixe vira resíduo sólido. A produção de 1 kg de filé de tilápia necessita de mais de 3 kg de tilápia (Barroso et al, 2019).

De acordo com a NBR 10.004 (ABNT, 2004), resíduos sólidos são definidos como materiais de natureza sólida ou semissólida, gerados a partir de atividades industriais, comerciais, domésticas, agrícolas e de produção animal. Esses resíduos podem ser classificados em duas categorias principais:

- Resíduos de classe I, são os materiais considerados perigosos com características físicas, químicas ou infectocontagiosas passíveis de transmitir risco à saúde pública e ao meio ambiente.
- Resíduos de classe II, caracterizados por materiais não perigosos que podem ser divididos em: componentes com solubilidade em água passíveis de biodegradação ou componentes não inertes, insolúveis no substrato em que esteja presente.

A produção de filés de tilápia resulta em uma quantidade substancial de resíduos sólidos, que compõem a maior parte do peixe. Tradicionalmente, esses resíduos são utilizados para fabricar produtos de baixo valor agregado, como farinha e óleo de peixe. Além disso, há iniciativas que buscam aproveitar esses subprodutos na produção de ração animal, fertilizantes e biocombustíveis, promovendo a sustentabilidade e a economia circular na indústria aquícola (Pedroza Filho et al, 2020). O uso eficiente desses resíduos é essencial para reduzir o impacto ambiental e aumentar a viabilidade econômica da produção de tilápia (FAO, 2022).

A utilização da pele de tilápia para a produção de colágeno emerge como uma estratégia sustentável e de alto valor agregado para o reaproveitamento de resíduos provenientes da aquicultura. O colágeno, um biomaterial de amplo interesse nas indústrias cosmética, alimentícia, biomédica e farmacêutica, possui aplicações diversificadas, incluindo a administração de medicamentos, tratamento de feridas, engenharia tecidual e desenvolvimento de substitutos ósseos (Gaikwad et al., 2024). Tradicionalmente, as principais fontes de colágeno são de origem bovina e suína, extraídas de couro, ossos e pele de porco, devido à sua elevada similaridade com a sequência de aminoácidos do colágeno humano (Gaikwad et al., 2024).

No entanto, o uso de colágeno bovino e suíno apresenta riscos potenciais à saúde humana, como a transmissão de doenças, incluindo encefalopatia espongiforme bovina, febre aftosa e scrapie, além de outras zoonoses. Adicionalmente, questões culturais e religiosas, como

as restrições alimentares de comunidades hindus, judias e muçulmanas, limitam o consumo de produtos derivados dessas fontes (Bhagwat et al., 2016). Nesse contexto, o colágeno de origem aquática surge como uma alternativa segura e viável, uma vez que estudos demonstram sua não citotoxicidade, ausência de reações intracutâneas e baixa toxicidade sistêmica aguda (Yamamoto et al., 2015).

Apesar das vantagens, o colágeno de origem aquática apresenta desafios, como baixa temperatura de desnaturação, propriedades mecânicas limitadas e rápida biodegradação. Para superar essas limitações e aprimorar suas propriedades, a reticulação do colágeno tem sido amplamente investigada. Essa reticulação pode ser realizada por métodos químicos, enzimáticos ou físicos, com agentes de reticulação como glutaraldeído, formaldeído e EDC/NHS sendo frequentemente explorados na literatura para diversas aplicações (Sionkowska et al., 2024).

3.3 RETICULAÇÃO DO COLÁGENO

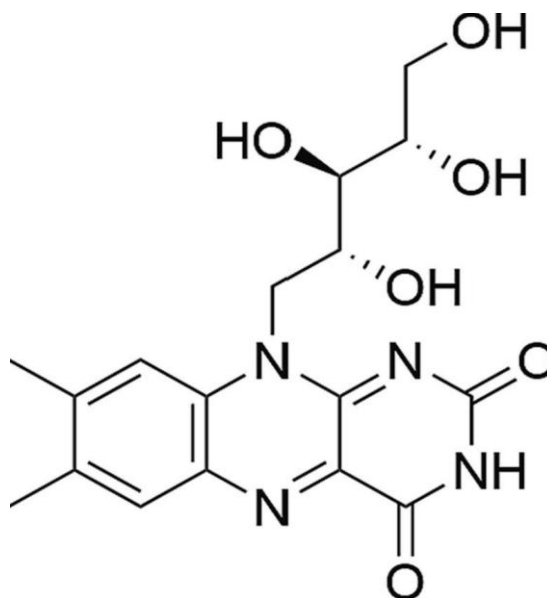
O colágeno reticulado é amplamente empregado na engenharia de tecidos devido à sua maior aplicabilidade e versatilidade. A reticulação, promove a formação de ligações cruzadas entre as cadeias de colágeno e pode ser realizada por métodos químicos ou físicos. Nos processos químicos, agentes reticulantes com grupos reativos são utilizados para criar ligações entre as cadeias laterais de aminoácidos de moléculas proteicas adjacentes. Dentre os agentes mais empregados, destacam-se aldeídos, isocianatos, haletos de alquila e arila, imidoésteres, carbodiimidas, maleimidas N-substituídas e compostos de acilação (Weadock et al., 1983). Um dos reticulantes mais comuns é a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que reage com grupos amina para promover a reticulação. No entanto, a toxicidade dos subprodutos gerados por essa reação ainda não é completamente compreendida (Brebu et al., 2024). Outro agente amplamente utilizado é o glutaraldeído, que, apesar de sua eficácia, apresenta limitações relacionadas à carcinogenicidade e citotoxicidade (Patil et al., 2020).

A escolha do método e do agente de reticulação confere ao colágeno variedade de formas e propriedades. Por exemplo, a formação de hidrogéis de colágeno ocorre por meio da neutralização do colágeno solubilizado em ácido, permitindo a automontagem das fibrilas em pH próximo ao fisiológico (Walimbe et al., 2020). Esse ambiente, com pH em torno de 7, é ideal para mimetizar as condições fisiológicas, resultando em estruturas semelhantes às encontradas em tecidos naturais de colágeno tipo I.

A concentração de colágeno e a temperatura são fatores críticos que influenciam as características do hidrogel. Concentrações mais altas produzem materiais com maior densidade de fibrilas e rigidez mecânica, enquanto temperaturas reduzidas favorecem a formação de fibrilas mais longas e organizadas, similares às encontradas em tecidos naturais (Yang et al., 2017). Essa versatilidade na modulação da microestrutura e das propriedades mecânicas é fundamental para adaptar os hidrogéis a diversas aplicações, como na regeneração tecidual ou sistemas de liberação controlada de fármacos (Heo et al., 2016).

A busca por agentes de reticulação que combinem eficiência, biocompatibilidade e métodos de aplicação simplificados tem motivado pesquisas nas últimas décadas, especialmente diante dos desafios relacionados à citotoxicidade de reticulantes convencionais. Nesse cenário, a reticulação fotossensibilizada por riboflavina destaca-se como uma alternativa promissora, por possibilitar a formação de hidrogéis fortalecidos e biocompatíveis (Elmassry et al., 2020). No entanto, aspectos como a estabilidade mecânica, as propriedades físico-químicas e os mecanismos de reação envolvidos na reticulação mediada por riboflavina ainda carecem de estudos mais aprofundados na literatura (Heo et al., 2016).

A riboflavina (Figura 5) é uma vitamina hidrossolúvel essencial, pertencente ao complexo B, amplamente distribuída em alimentos de origem vegetal e animal. Em fontes vegetais, como legumes, grãos integrais e cereais fortificados, a riboflavina está presente em quantidades variáveis, enquanto em alimentos de origem animal, como laticínios, carnes (especialmente fígado), ovos e peixes, sua concentração tende a ser mais elevada (Olfat et al., 2022). Inicialmente isolada do leite em 1933, sua estrutura química foi posteriormente elucidada, revelando um núcleo isoaloxazina ligado a uma cadeia de ribitol, um carboidrato de cinco carbonos, que confere à molécula suas propriedades físico-químicas e biológicas únicas (Beztsinna et al., 2016). Comercialmente, a riboflavina é disponibilizada como um pó cristalino de coloração amarelo-alaranjada, caracterizada por sua estabilidade térmica, mas com sensibilidade à luz ultravioleta, o que pode levar à sua degradação fotoquímica. Além disso, sua solubilidade em água é limitada (aproximadamente 1 g em 3–15 litros de água), o que influencia sua biodisponibilidade e aplicações em formulações farmacêuticas e alimentícias.

Figura 5 - Estrutura química da riboflavina

Fonte: Insińska-Rak et al, 2024.

No organismo, a riboflavina desempenha um papel crucial no metabolismo energético, atuando principalmente como precursora de duas coenzimas biologicamente ativas: o flavina mononucleotídeo (FMN) e o flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Essas coenzimas estão envolvidas em uma variedade de reações redox, servindo como transportadoras de elétrons em processos metabólicos essenciais, como a respiração celular e o ciclo de Krebs (Rucker et al., 2008). O FAD, em particular, atua como cofator para enzimas desidrogenases em condições anaeróbicas, enquanto o FMN está mais associado a reações oxidativas em ambientes aeróbicos. Durante essas reações, as flavinas podem interagir com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como subproduto da transferência de elétrons. Essa capacidade de participar de reações redox torna a riboflavina um componente vital em sistemas biológicos, além de ser explorada em aplicações industriais e biomédicas, como em terapias fotodinâmicas e processos de desinfecção (Beztsinna et al., 2016).

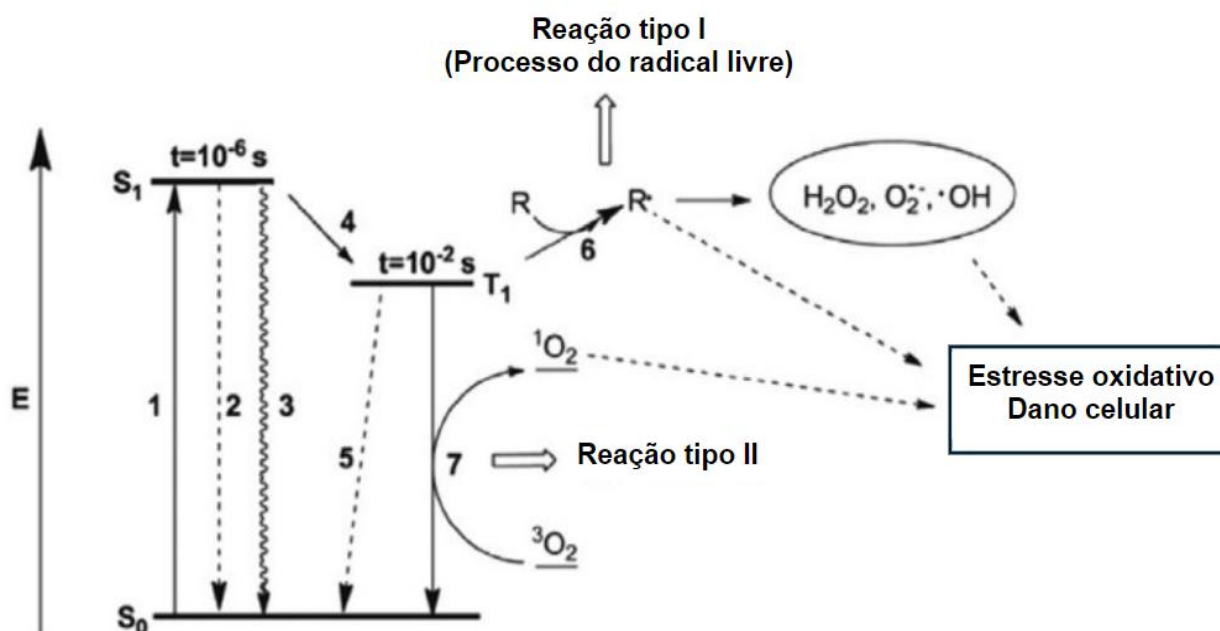
A importância da riboflavina na saúde humana é evidenciada por sua participação em processos como a síntese de glóbulos vermelhos, a manutenção da integridade da pele e das mucosas, e o suporte ao sistema nervoso. Deficiências dessa vitamina podem levar a condições como a ariboflavinose, caracterizada por lesões na boca, dermatites e distúrbios oculares, destacando a necessidade de sua ingestão adequada por meio da dieta ou suplementação (Olfat et al., 2022). Além disso, estudos recentes têm explorado o potencial da riboflavina como agente antioxidante e anti-inflamatório, ampliando seu escopo de aplicações na medicina e na nutrição.

A molécula de riboflavina possui propriedades fotofísicas notáveis, principalmente devido à presença do anel isoaloxazina em sua estrutura, que é responsável por sua capacidade de absorver luz em comprimentos de onda específicos. Essa absorção ocorre predominantemente na região do ultravioleta (UV) e no espectro visível, com máximos de absorção em 300 nm e 370 nm (UV) e 435 nm (azul visível). Quando exposta à luz UV-A ou visível, a riboflavina é excitada para um estado eletrônico singlete, caracterizado por uma fluorescência intensa e um tempo de vida curto, da ordem de 5 nanossegundos ns em meio aquoso (Beztsinna et al., 2016). Esse estado singlete é altamente energético e pode sofrer decaimento por meio de um processo conhecido como cruzamento intersistêmico, no qual a molécula transita para um estado tripleto, com um tempo de vida significativamente mais longo, da ordem de 15 μ s.

O estado tripleto da riboflavina é particularmente reativo, atuando como um poderoso agente oxidante birradical. Nesse estado, a molécula pode interagir com uma variedade de biomoléculas, promovendo reações de oxidação. Além disso, o estado tripleto é capaz de transferir energia para o oxigênio molecular (O_2) presente no meio, gerando oxigênio singlete (1O_2), uma espécie reativa de oxigênio altamente eletrofílica e com grande potencial oxidativo (Beztsinna et al., 2016). O oxigênio singlete, por sua vez, desempenha um papel crucial em processos fotoquímicos, como a reticulação de fibrilas de colágeno. Essa reação ocorre quando o oxigênio singlete interage com as cadeias de colágeno, promovendo a formação de ligações cruzadas entre as fibrilas e, conseqüentemente, a estabilização da estrutura tridimensional da proteína (Heo et al., 2016). Esse mecanismo é amplamente explorado em aplicações biomédicas, como no tratamento de ceratocone, onde a riboflavina é utilizada em conjunto com luz UV-A para induzir a reticulação do colágeno corneal e fortalecer o tecido.

O processo de fotoabsorção e as transições eletrônicas da riboflavina podem ser representados por um diagrama de Jablonski modificado, que ilustra as mudanças de energia entre os estados singlete e tripleto, bem como a geração de oxigênio singlete. Esse diagrama destaca a fluorescência característica da riboflavina, o cruzamento intersistêmico e a formação do estado tripleto, que é central para suas propriedades fotossensibilizadoras. A figura 6 apresenta o diagrama de Jablonski modificado para o processo de fotofísico da riboflavina.

Figura 6 - Diagrama de Jablonski modificado. Processo fotofísico: 1) absorção; 2) fluorescência; 3) conversão interna; 4) cruzamento intersistemas; 5) fosforescência; 6) formação de radicais livres por transferência de energia do fotossensibilizador T1 para substratos biológicos; e 7) formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) por transferência de energia do fotossensibilizador T1 para oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$).



Fonte: Beztsinna et al., 2016.

O uso da riboflavina no tratamento do ceratocone, uma doença degenerativa da córnea caracterizada por afinamento, deformação e perda de elasticidade do tecido corneano, resultando em comprometimento visual progressivo (Santhiago et al., 2020), tem se mostrado uma abordagem promissora. O tratamento, conhecido como crosslinking corneano (CXL), baseia-se na saturação do estroma corneano com riboflavina, seguida da exposição à luz UV. Essa combinação induz uma reação fotoquímica que promove a formação de ligações covalentes entre as fibras de colágeno, aumentando a rigidez e a estabilidade biomecânica da córnea, o que impede a progressão da doença (Abdshahzadeh et al., 2022). Estudos clínicos demonstram que o CXL com riboflavina é eficaz em reduzir a curvatura corneana (K_{max}) e melhorar a acuidade visual em pacientes com ceratocone progressivo, com taxas de sucesso superiores a 90% em alguns casos (Wollensak et al., 2003; Raiskup et al., 2019).

Apesar do sucesso clínico no tratamento do ceratocone, o potencial da riboflavina como agente de reticulação para outras aplicações biomédicas ainda é pouco explorado. A sua capacidade em formar ligações cruzadas sem introduzir subprodutos tóxicos, aliada à sua

biocompatibilidade, sugere que esse composto pode ser adaptado para o desenvolvimento de hidrogéis e outros biomateriais à base de colágeno, com aplicações em engenharia tecidual e medicina regenerativa (Elmassry et al., 2020). Por exemplo, a reticulação fotoinduzida de colágeno com riboflavina tem sido investigada para a criação de matrizes extracelulares artificiais, que podem ser utilizadas no reparo de tecidos danificados, como pele, cartilagem e ossos. Esses biomateriais apresentam vantagens significativas, como a capacidade de modular a rigidez e a porosidade da matriz, fatores críticos para a migração e proliferação celular (Heo et al., 2016). No entanto, estudos que investiguem a estabilidade mecânica, a cinética de reticulação e as propriedades biológicas desses materiais ainda são pouco explorados. A otimização dos parâmetros de reticulação, como tempo de exposição à luz, concentração de riboflavina e intensidade da radiação UV, é essencial para garantir a funcionalidade e a segurança desses biomateriais em aplicações clínicas (Beztsinna et al., 2016).

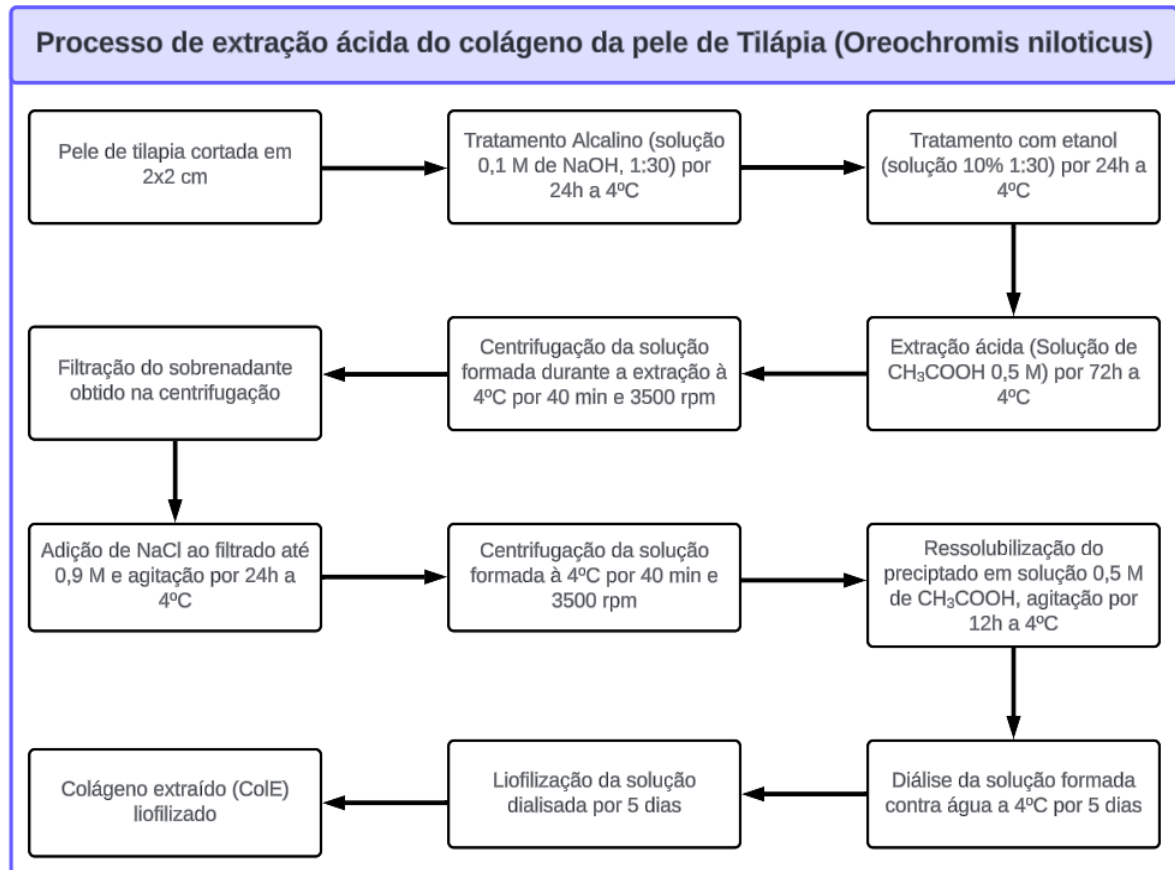
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve, de forma detalhada, os procedimentos experimentais adotados no presente estudo, os quais foram organizados em duas etapas principais: a extração do colágeno a partir da pele de tilápia e a subsequente reticulação fotoinduzida por riboflavina, visando à formação de hidrogéis. Um fluxograma é apresentado com o intuito de proporcionar uma visão clara e sistematizada das etapas desenvolvidas, abrangendo os métodos e técnicas empregados. Também são descritas as caracterizações realizadas em cada fase do projeto, com o objetivo de avaliar as propriedades físico-químicas e estruturais dos materiais obtidos.

4.1 FLUXOGRAMA

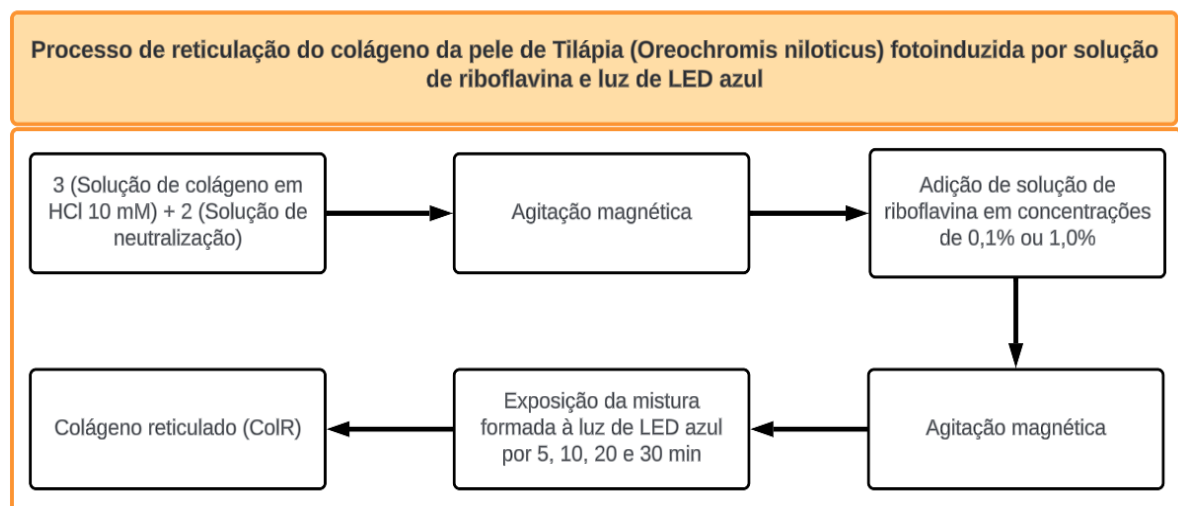
A Figura 7 ilustra o fluxograma referente ao processo de extração do colágeno obtido da pele de tilápia (ColE), enquanto a Figura 8 apresenta o fluxograma da metodologia aplicada na reticulação fotoinduzida por solução de riboflavina nas concentrações de 0,1% e 1,0%, sob exposição à luz LED azul por períodos de 5, 10, 20 e 30 minutos, para a formação do hidrogel de colágeno (ColR).

Figura 7 – Fluxograma do processo de extração de colágeno da pele de tilápia.



Fonte: Autoria própria.

Figura 8 – Fluxograma da metodologia aplicada na reticulação fotoinduzida por solução de riboflavina nas concentrações de 0,1% e 1,0%, sob exposição à luz de LED azul por períodos de 5, 10, 20 e 30 minutos.



Fonte: Autoria própria.

4.2 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram a pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), doada pela empresa Copacol - cooperativa agropecuária consolata. Hidróxido de sódio anidro, ácido acético glacial, etanol absoluto, cloreto de sódio anidro, todos obtidos da empresa Merck. Malha de Nylon Falcon Cell Strainer 100 µm. Membrana de celulose para tubos de diálise 12 a 14 kDa (Sigma-Aldrich). Riboflavina (Sigma-Aldrich). Padrão de massa molecular Bio-Rad Precision Plus Protein™ Standards dual color com uma escala de massa molecular de 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa e 10 kDa. Solução de Colágeno tipo I bovino (Sigma-Aldrich). Células Vero (células epiteliais renais extraídas do macaco-verde africano), adquiridas comercialmente (Banco de Células do Rio de Janeiro - código 0245, Rio de Janeiro, Brasil). Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Low glucose) (Sigma®). Soro fetal bovino (SFB) (CultLab©). Antibiótico/antimicótico Penicilina/Estreptomicina (Sigma®). Dimetilsulfóxido (DMSO) (LabSynth-Brasil). Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma©).

4.3 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO

Para a extração de colágeno foi utilizada a pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), a qual foi embalada e armazenada a -20 °C até o uso. O colágeno foi extraído por hidrólise ácida segundo a metodologia empregada no procedimento reportado por Liu et al 2012, com algumas modificações. As peles de tilápia previamente limpas e higienizadas foram cortadas em pequenos pedaços de 2x2 cm, em seguida foram imersas em solução de NaOH 0,1 M na proporção 1:30 (massa/volume) por 24h sob agitação constante à 4 °C. Após as 24h as peles foram lavadas com água destilada na faixa de temperatura entre 2 a 8 °C repetidas vezes até que o pH da água contendo as peles atingisse o valor 6. As peles então foram secas com papel absorvente e em seguida imersas em solução de etanol 10% na proporção 1:30 (massa/volume) por 24h sob agitação constante à 4 °C, após esse período as peles foram novamente lavadas com água destilada na faixa de temperatura entre 2 a 8 °C e secas com papel absorvente.

A extração do colágeno foi realizada mediante a imersão das peles tratadas em uma solução de ácido acético 0,5 M, na proporção 1:40 (massa/volume), por um período total de 72 horas. Durante esse processo, a solução foi submetida a ciclos de 12 horas sob agitação constante a 4 °C, seguidos de 12 horas de armazenamento sob refrigeração (overnight). A solução resultante da extração foi centrifugada a 4 °C por 40 minutos a 3500 rpm, utilizando

uma centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5804R*. O sobrenadante obtido foi filtrado em malha de nylon com abertura de 100 μm , descartando-se o precipitado formado.

Posteriormente, o sobrenadante filtrado foi salinizado de forma gradual com NaCl até atingir a concentração de 0,9 M, permanecendo sob agitação por 12 horas a 4 °C. Em seguida, o conteúdo foi novamente centrifugado a 4 °C por 40 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante dessa etapa foi descartado, e o precipitado foi ressolubilizado em solução de ácido acético 0,5 M, mantido sob agitação por 12 horas a 4 °C e, posteriormente, armazenado sob refrigeração (overnight).

A solução resultante foi transferida para bolsas de diálise com limite de exclusão molecular de 12 a 14 kDa, sendo dialisada contra água destilada a 4 °C por um período de 5 dias. Após a diálise, o colágeno extraído da pele de tilápia (CoIE) foi submetido à liofilização por 5 dias e armazenado para caracterizações posteriores.

4.3.1 Avaliação do Rendimento

O cálculo do rendimento das extrações foi realizado a partir da relação entre a massa do CoIE e a pele de tilápia *in natura*, levando em consideração a massa total da pele intumescida de acordo com a equação (1):

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{massa do colágeno extraído}}{\text{massa da pele de tilápia in natura}} \times 100 \quad (1)$$

4.3.2 Espectroscopia Na Região Do Infravermelho Com Transformada De Fourier Com Refletância Total Atenuada (FT-IR-ATR)

Os espectros de FTIR das amostras de colágeno extraído da pele de tilápia (CoIE) liofilizado, do colágeno fotorreticulado por riboflavina (CoIR) liofilizado e do colágeno comercial tipo I bovino liofilizado, foram obtidos utilizando um espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 65, com módulo ATR. As análises foram realizadas em comprimentos de onda entre 4000 e 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

As massas moleculares das amostras de colágeno extraído da pele de tilápia (CoIE) e colágeno comercial tipo I bovino foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida

com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). Para a preparação dos géis de poli(acrilamida), utilizou-se um sistema de sanduíche de placas de vidro, onde foram pipetados, respectivamente, o gel de resolução na base e o gel de empilhamento sobre o gel de resolução.

- O Gel de resolução foi preparado nas seguintes proporções: 7,5% Acrilamida-bisacrilamida, 0,375M TRIS-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05 % de persulfato de amônio e 0,05 % TEMED.
- O Gel de empilhamento foi preparado nas seguintes proporções: 4% Acrilamida-bisacrilamida, 0,125M TRIS-HCl pH6,8; 0,1% SDS; 0,05 % de persulfato de amônio e 0,1% TEMED.

As amostras foram preparadas em alíquotas contendo as proteínas de interesse misturadas na proporção 1:1 ao tampão de amostra (TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8; 20% de glicerol; 40% SDS 10%; 10% 2-mercapetanol e 0.05% de bromofenol-blue) e aquecidas a 95°C por 5 minutos em um Thermomixer Eppendorf Comfort para que desnaturassem.

Os géis previamente preparados foram posicionados em uma cuba de eletroforese e imersos em tampão de corrida (composto por 16,3% de TRIS, 78% de glicina e 5,4% de SDS, com pH ajustado para 8,3). Posteriormente, foi adicionado ao gel o padrão de referência de massa molecular Bio-Rad Precision Plus Protein™ Standards dual color, seguido pela pipetagem das amostras nos poços do gel. O sistema foi submetido à eletroforese por um período de 40 minutos, sob uma tensão constante de 200 V.

Após a eletroforese, os géis foram cuidadosamente removidos e imersos em uma solução corante alcoólica contendo Azul de Coomassie, sob agitação lenta, por aproximadamente 60 minutos. Em seguida, os géis foram transferidos para água destilada para o processo de descoloração, mantendo-se a agitação lenta. A água foi substituída a intervalos de 20 minutos até que as bandas de massas moleculares se tornassem visíveis. Por fim, os géis foram retirados da solução e envoltos em plástico filme para sua adequada preservação.

4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar a microestrutura e morfologia das superfícies da amostra de colágeno extraído. As amostras de ColE foram previamente fixadas e desidratadas. A desidratação é necessária para remover a água e evitar

artefatos, além de melhorar a condutividade da amostra, permitindo a formação de imagens claras e detalhadas. Para tal, as amostras foram cortadas em aproximadamente 8 mm, adicionadas em placa de 24 poços e nelas foram inseridos 500 µL de paraformaldeído a 4% (PFA) por 1 h. Depois, o PFA foi retirado e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS estéril. Para o processo de desidratação, as amostras foram imersas em soluções de água destilada contendo 30%, 50%, 70%, 90% de etanol (1x) e em seguida em etanol 100% (2x), cada imersão durou 30 minutos. Após a etapa de desidratação, o etanol foi removido. Em seguida, foram adicionados 500 µL de HMDS em um tubo Falcon. Em outro tubo Falcon, foi preparada uma solução na proporção 1:1 de HMDS e álcool 70%. Posteriormente, a solução foi adicionada sobre as amostras (até cobri-las) e deixada agir por 10 minutos. Depois, a solução anterior foi substituída por HMDS puro, que agiu por mais 10 minutos para completar a desidratação das amostras. Após esse período, as amostras foram retiradas do HMDS e submetidas à secagem na capela.

As imagens foram obtidas por elétrons secundários sob 5kV em spot size de 50 nm, em WD de 7 a 8 mm, sob alto vácuo no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6490LV.

4.3.5. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C)

Foram obtidos espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido, da amostra de colágeno extraído da pele de tilápia e do colágeno bovino tipo I comercial, a fim de comparar e elucidar a preservação da estrutura de tripla hélice do colágeno extraído. Os espectros foram registrados em um espectrômetro Bruker CXP-300 equipado com um acessório de polarização cruzada-giro de ângulo mágico (CP-MAS).

4.4 RETICULAÇÃO DO HIDROGEL DE COLÁGENO

O colágeno extraído da pele de tilápia (ColE) liofilizado foi ressolubilizado em uma solução de HCl 0,01 M, resultando em uma concentração final de 9 mg/mL. Em seguida, foi preparada uma solução de neutralização contendo 1 N de NaOH (75 µL), água destilada (1425 µL) e PBS 10x (500 µL). A riboflavina foi solubilizada em PBS a uma concentração de 0,1% e 1,0%. A solução de neutralização e o colágeno solubilizado foram misturados na proporção de 2:3 e homogeneizados. Em seguida, a solução de riboflavina foi adicionada na mesma quantidade da solução de neutralização. As amostras foram expostas a luz LED azul em uma câmara escura por 5, 10, 20 e 30 minutos, a uma distância de 5 cm da fonte, formando hidrogéis reticulados (ColR), que foram caracterizados posteriormente.

4.4.1 Teste de intumescimento

As propriedades de intumescimento (S_w) foram medidas a fim de caracterizar o teor de intumescimento do material e seu grau de reticulação. Os hidrogéis reticulados liofilizados foram pesados e imersos em 10 mL de tampão PBS a 37°C. Após determinados períodos, o hidrogel foi retirado do tampão e novamente pesado. O intumescimento foi calculado de acordo com a equação (2):

$$S_w = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100 \% \quad (2)$$

Em que M_2 é a massa da amostra intumescida, M_1 é a massa da amostra liofilizada.

4.5 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

As análises de termogravimetria foram realizadas em um equipamento TA Instruments, modelo TGA 55. Foram utilizados aproximadamente 5 mg de amostra liofilizada, tanto do ColE quanto do ColR. A análise térmica foi processada em um intervalo de temperatura entre 20 e 600 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de nitrogênio de 100 ml/min.

4.6 ENSAIOS REOLÓGICOS

Para a determinação das propriedades reológicas, foram preparadas soluções de amostras de colágeno extraído da pele de tilápia, utilizando água destilada e HCl (0,01 M) como solventes. As análises foram conduzidas em um reômetro DHR-2 da TA Instruments. Os ensaios foram realizados a 25 °C, empregando-se uma geometria do tipo cone-placa com diâmetro de 40 mm e um espaçamento (gap) de 55 µm.

Inicialmente, foi realizado um ensaio em regime oscilatório, com testes de varredura de amplitude. Para esse ensaio, a taxa de deformação foi variada entre 0,01% e 100%, mantendo-se uma frequência angular constante de 10 rad·s⁻¹, com o objetivo de determinar a região de viscoelasticidade linear (LVR) das amostras. O valor de LVR obtido foi subsequentemente utilizado para o ensaio em regime oscilatório de frequência com varredura de temperatura.

Nesse segundo ensaio, para a obtenção dos módulos de perda (G'') e de armazenamento (G'), foram empregados uma frequência angular de 10 rad·s⁻¹, um intervalo de temperatura de 5 a 60 °C e uma taxa de aquecimento de 1,0 °C/min.

4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio foi conduzido de acordo com as normas internacionais para citotoxicidade e interação célula-biomaterial (ASTM F813-20, 2011; ISO 10993-5, 2009; ISO 10993-12, 2012). A cultura de células Vero (células epiteliais renais extraídas do macaco-verde africano) foi adquirida comercialmente (Banco de Células do Rio de Janeiro - código 0245, Rio de Janeiro, Brasil) e mantida em frascos de cultura de 75 cm² até a confluência. Tais células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Low glucose) (Sigma®), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (CultLab©) e 1 mL de antibiótico/antimicótico Penicilina/Estreptomicina (Sigma®). Quando atingiram confluência/alta densidade nos frascos, as células foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/mL, utilizando 200 µL de suspensão celular. As culturas foram então incubadas em condições padrão a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24h. Após este período o extrato das amostras (meio de cultura+ material) de ColE, ColR 0,1% - 5 min, ColR 0,1% - 20 min, ColR 1,0 % - 5 min e ColR 1,0% 20 min foram expostas às células e novamente incubadas sob condições padrão por 24h. O controle negativo (CTL-) consistiu em células sem exposição ao material, cultivadas diretamente na placa e o controle positivo (CTL+) o qual as células foram submetidas à indução de morte celular por exposição ao dimetilsulfóxido (DMSO) (LabSynth-Brasil), servindo como referência para o experimento.

O ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma©) foi realizado para todas as amostras, após o período pré-estabelecidos. O meio de cultura foi removido, e as células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar com 200 µL de solução de MTT a uma concentração de 0,0005g/mL em meio de cultura fresco. Após 3h de incubação, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em solução de DMSO. A quantidade de formazan foi então medida por absorbância a 570 nm utilizando um leitor de placas (Elx-800, Biotek©). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad (Prism 10.0.2, EUA). As comparações estatísticas entre os diferentes tempos foram feitas por ANOVA com o teste de Tukey. Foi considerado um intervalo de confiança de 95% e um nível de significância de $p < 0,05$ (*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO

O ColE, após o processo de liofilização, apresentou coloração esbranquiçada, aspecto fibroso e textura macia, semelhante ao algodão (Figura 9). O rendimento da extração foi calculado utilizando a equação previamente descrita, obtendo-se uma média de $20 \pm 3,6\%$ em relação à massa da pele de tilápia in natura. Esse resultado está em concordância com dados reportados na literatura, como os observados por Menezes et al. (2020), que obtiveram um rendimento de 19% na extração ácida de colágeno a partir da pele de tilápia. O rendimento relativamente baixo pode ser atribuído ao elevado teor de água presente na pele de tilápia in natura, o que contribui para o aumento da massa do material bruto. A remoção da água durante o processo de liofilização concentra os componentes sólidos, resultando em uma fração menor de extrato final em relação à massa inicial da pele fresca.

Figura 9 - Fotografia da amostra de colágeno extraído (ColE) após o processo de liofilização.

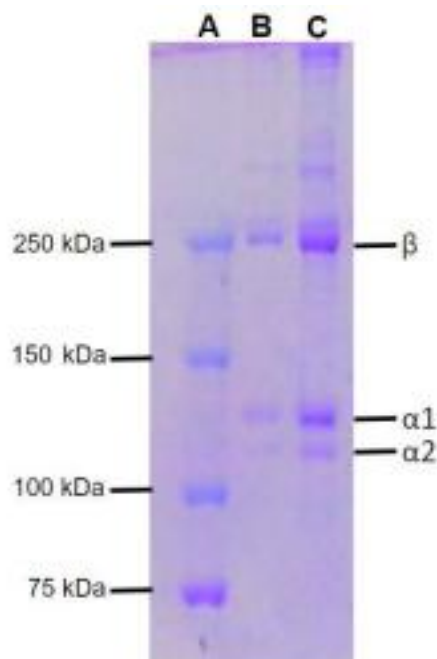


Fonte: autoria própria.

5.3 - SDS-PAGE

A análise por SDS-PAGE foi realizada com o objetivo de determinar o padrão de massa molecular do ColE. Os padrões eletroforéticos obtidos, apresentados na Figura 10, mostram o padrão de massa molar (A), a amostra de ColE (B) e, para comparação, o colágeno tipo I bovino comercial (C). A comparação com o colágeno tipo I bovino comercial permite validar a similaridade estrutural da amostra ColE, assegurando, também, que os procedimentos de extração e purificação foram eficazes.

Figura 10 – Análise SDS-PAGE do padrão de massa molar (A), amostra de colágeno extraído da pele de tilápia (B) e do colágeno tipo I bovino (C).



Fonte: autoria própria

A amostra ColE é composta pelas bandas características das duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ encontradas na região compreendida entre 100 e 150 kDa. Também é possível observar a presença de componentes de alta massa molecular, como cadeias γ (trímeros) e cadeias β (dímeros). Em particular, as cadeias β foram encontradas em cerca de 250 kDa e as cadeias γ em valores acima de 250 kDa .

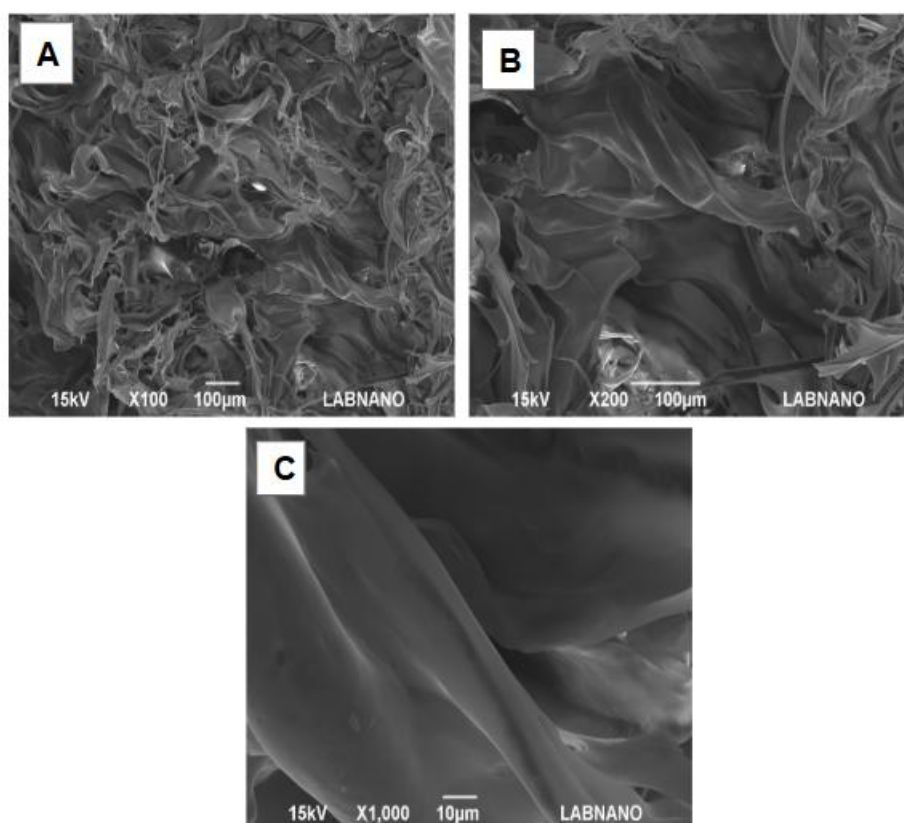
As massas moleculares médias das bandas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da amostra ColE foram determinadas a partir dos valores do fator de retenção das proteínas da amostra padrão, com massas moleculares conhecidas. A partir desses valores, em centímetros, foi construída uma reta, e pela equação da reta, as massas moleculares médias das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ foram calculadas sendo 112 kDa e 124 kDa, respectivamente. O que corrobora com os resultados encontrados por Song et al, 2021 em que foram encontrados os valores de 113 kDa para as cadeias $\alpha 1$ e 123 kDa para as cadeias $\alpha 2$ (Song et al, 2021). Também é possível observar que a intensidade da banda $\alpha 1$ foi maior do que a $\alpha 2$, confirmando que os colágenos extraídos continham duas subunidades idênticas de $\alpha 1$ e apenas uma $\alpha 2$, o que era consistente com a composição molecular do colágeno tipo I (Song et al, 2021). Conforme pode ser observado, o colágeno bovino tipo I comercial apresentou as bandas características das cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$ e β , com as mesmas mobilidades eletroforéticas que o colágeno extraído da pele de tilápia (ColE). Isso indica que a composição de subunidades

e a mobilidade eletroforética são similares (Sato et al, 1988). Com isso é possível sugerir que a amostra de colágeno extraída era composta principalmente de colágeno tipo I, um heterotrímero contendo duas cadeias $\alpha 1$ idênticas e uma cadeia $\alpha 2$ na forma molecular de $[\alpha 1(I)2 - \alpha 2(I)]$.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica do colágeno extraído foi realizada por meio de micrografias obtidas da superfície de amostras liofilizadas. Na Figura 11, observa-se que a amostra apresenta uma estrutura predominantemente amorfa e desorganizada, caracterizada por filamentos distribuídos de forma aleatória, confirmando a natureza fibrosa do colágeno (Song et al., 2021). Em maior ampliação, foi identificada uma morfologia semelhante à de folhas, organizadas em uma rede interconectada. Essa disposição estrutural resulta em uma matriz tridimensional, na qual os espaços intersticiais entre as folhas entrelaçadas conferem porosidade à estrutura do colágeno extraído o que facilita a sua aplicação em materiais de engenharia tecidual, facilitando a adesão e proliferação celular ((Heo et al., 2016).

Figura 11 – Fotomicrografia por MEV da superfície do colágeno extraído da pele de tilápia.

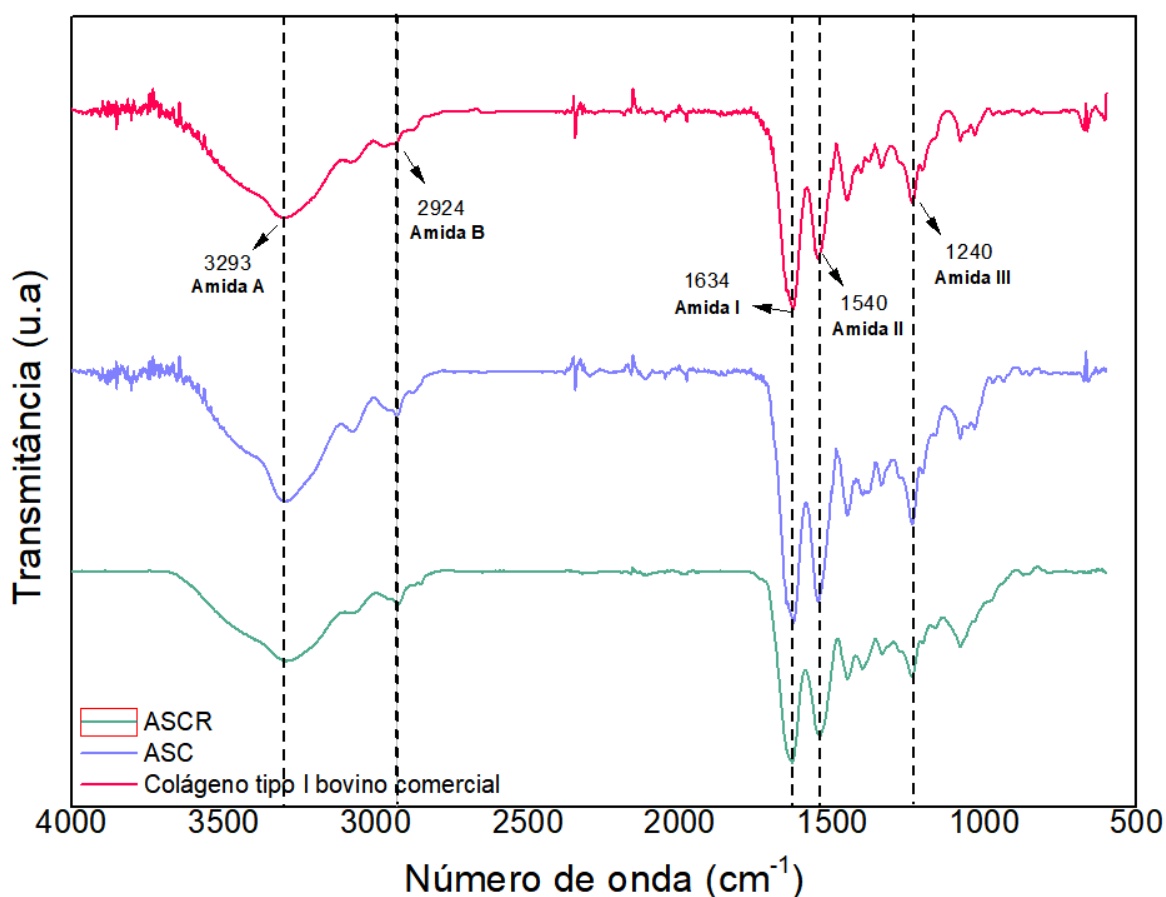


Fonte: autoria própria.

5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FT-IR-ATR)

A FTIR foi feita a fim de avaliar a estrutura do colágeno obtido a partir da extração ácida e compará-lo com o colágeno comercial tipo I bovino e com as amostras de ColR. figura 12 apresenta os espectros de FTIR das amostras ColE, ColR e colágeno comercial tipo I bovino, todas liofilizadas, fornecendo uma comparação das características estruturais observadas entre as amostras analisadas.

Figura 12 - Espectros de FTIR das amostras de colágeno extraído da pele de tilápia (ColE), colágeno extraído da pele de tilápia fotorreticulado com solução 1,0% de riboflavina (ColR) por 30 min e colágeno tipo I bovino comercial.



Fonte: autoria própria.

A amostra de ColE apresentou uma banda em 3300 cm^{-1} a qual está relacionada a vibração de estiramento N–H livre que comumente ocorre na faixa de $3400\text{--}3440 \text{ cm}^{-1}$. No entanto, se o grupo N–H de peptídeo faz parte de uma ligação de hidrogênio, a posição da banda da amida A é deslocada para um número de onda inferior, aproximadamente 3300 cm^{-1} , como observado neste trabalho (Song et al., 2019). As bandas relacionadas a amida B correspondem

aos estiramentos assimétricos de CH₂ observados na região entre 2920 cm⁻¹ (Riaz et al., 2018). A banda em 1651 cm⁻¹ está relacionada principalmente às vibrações de alongamento da ligação C=O referentes a amida I. A banda em 1544 cm⁻¹ é atribuída a amida II, correspondentes a vibração de flexão N–H acoplada a uma vibração de estiramento C–N. Entretanto, na faixa de 1550–1600 cm⁻¹ a mudança para números de onda mais baixos sugere a existência de ligações de hidrogênio (LIU et al., 2012). A banda em 1227 cm⁻¹ está associada a deformação N–H e vibrações de alongamento C–N característicos de amida III que ocorrem na faixa de 1220–1320 cm⁻¹ (GALLO et al., 2022).

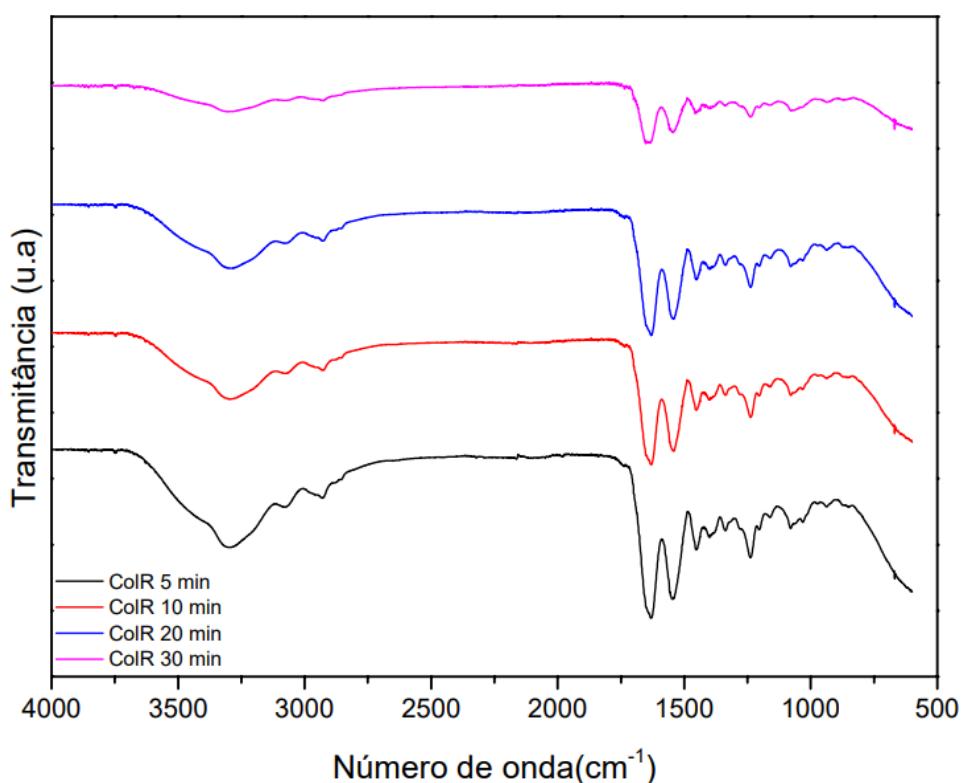
Para fins de comparação, foi realizada uma análise FTIR em uma amostra liofilizada de colágeno tipo I bovino comercial. O espectro FTIR obtido apresenta bandas na região de 3293 cm⁻¹ característica do estiramento N-H de amida A. Em 2924 cm⁻¹ observou-se uma banda indicativa de estiramentos assimétricos CH₂ de amida B. As bandas de amida I (1634 cm⁻¹) referem-se ao estiramento do grupo carbonila acoplado a um grupo carboxila, amida II (1540 cm⁻¹) ao dobramento N-H e estiramento C-N, e amida III (1240 cm⁻¹) à combinação do estiramento C-N com dobramento N-H (Sun et al, 2017). Por fim, comparando os espectros de FTIR das amostras ColE e colágeno tipo I bovino comercial é possível observar grande similaridade, indicando a presença das mesmas bandas com intensidades similares nos dois espectros. Esse resultado confirma que a amostra extraída da pele de tilápia corresponde efetivamente ao colágeno.

Após a reticulação do colágeno com as soluções de riboflavina, comparou-se o espectro FTIR da amostra ColR com solução de riboflavina a 1,0 % à amostra de ColE. Não foram observadas alterações significativas nas bandas espectrais, o que pode ser atribuído ao papel da riboflavina como fotossensibilizador. Diferentemente de outros agentes de reticulação, como o glutaraldeído, que atua diretamente formando ligações entre as cadeias polipeptídicas, a riboflavina, ao ser ativada pela luz azul, gera oxigênio singlete, responsável pela indução de ligações cruzadas entre os aminoácidos das cadeias de colágeno. Embora não sejam formadas novas bandas no espectro da amostra ColR, um leve aumento na intensidade das bandas em 1651 e 1544 cm⁻¹ pode ser identificado, sugerindo a formação de novas ligações C=N entre as cadeias, o que justifica o fortalecimento estrutural do material (Kang et al., 2021).

5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier com refletância total atenuada (FT-IR-ATR) das amostras reticuladas com as soluções de 0,1% e 1,0% de riboflavina em diferentes tempos

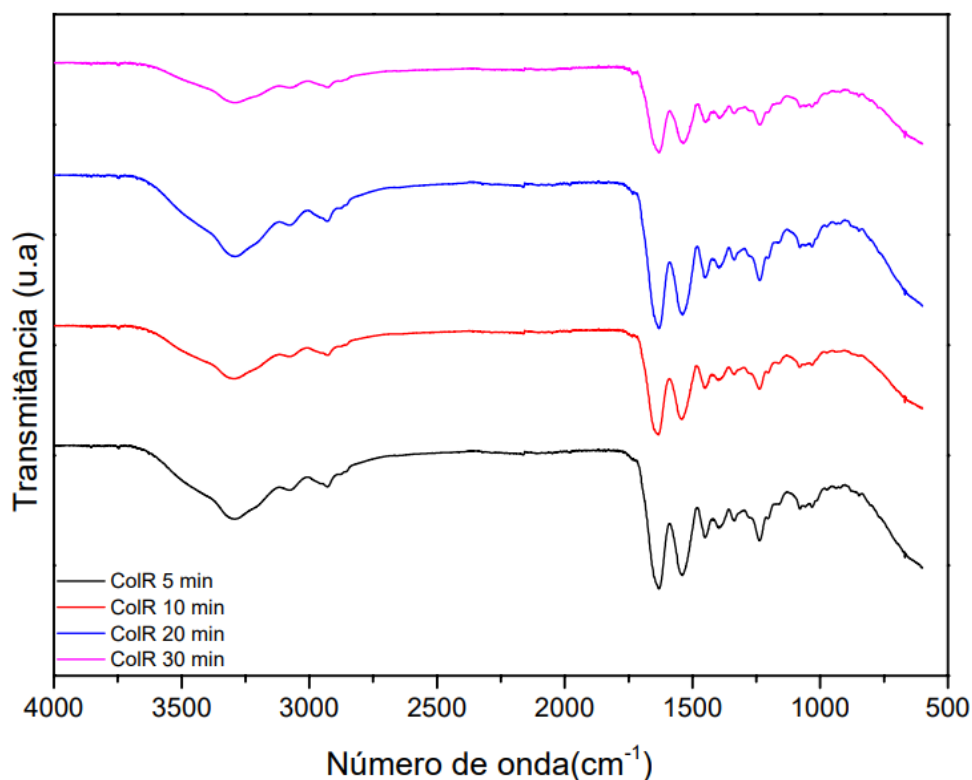
Os hidrogéis reticulados com soluções de riboflavina a 0,1% e 1,0 % foram avaliados por FTIR para verificar possíveis diferenças entre as concentrações utilizadas e os tempos de exposição à luz azul. Conforme apresentado nas figuras 13 e 14, não é possível observar variações significativas nos espectros em função do tempo de exposição. Tanto as amostras reticuladas com 1,0 % quanto aquelas com 0,1 % de riboflavina mantiveram as bandas características do colágeno previamente discutidas, além de um aumento nas intensidades das bandas em 1651 e 1544 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C=N, indicativo de novas ligações cruzadas. Esses dados também sugerem que os diferentes tempos de exposição à luz azul não causaram alterações estruturais significativas, como por exemplo a degradação do colágeno.

Figura 13 - Espectro FTIR de amostras de colágeno reticulado com solução de riboflavina 1,0 % nos tempos de 5, 10, 20, 30 minutos de exposição à LED luz azul.



Fonte: autoria própria.

Figura 14 - Espectro de amostras de colágeno reticulado com solução de riboflavina 0,1% nos tempos de 30, 20, 10 e 5 minutos de exposição à luz LED azul.

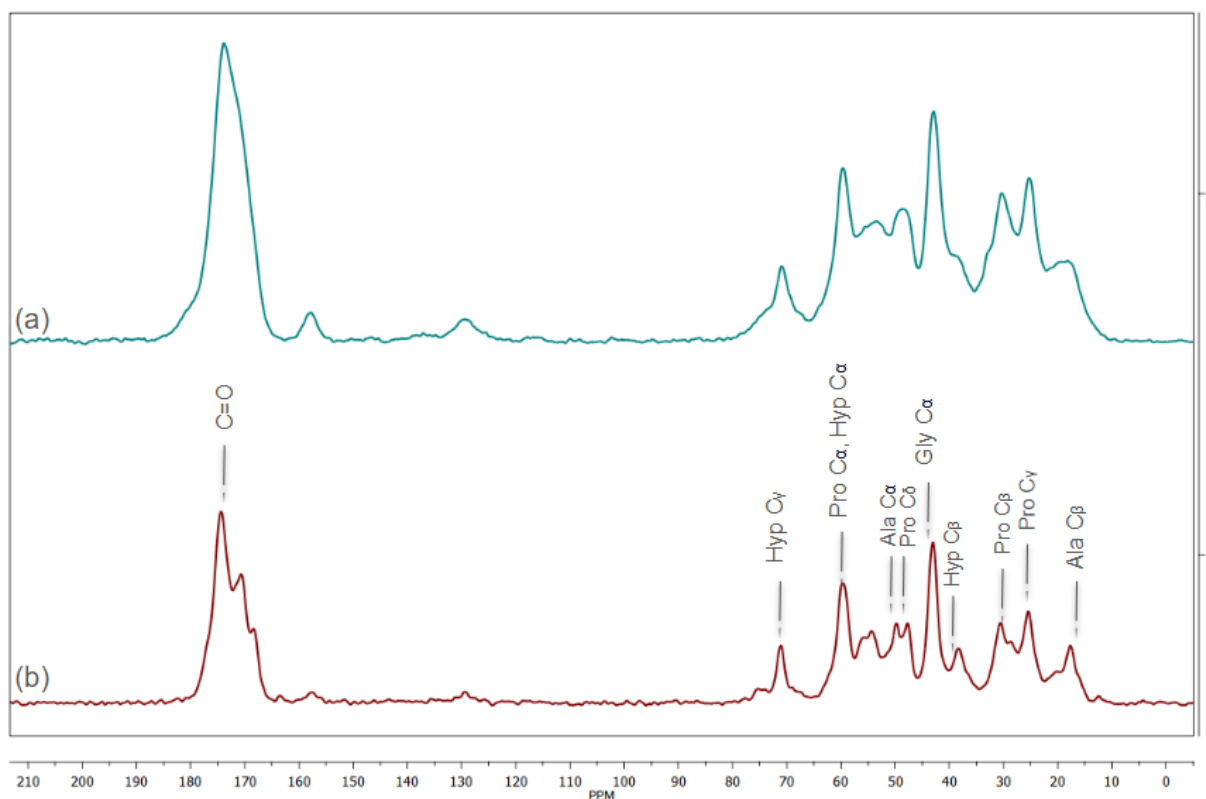


Fonte: autoria própria.

5.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O colágeno, em sua forma nativa, apresenta baixa solubilidade em água devido à sua natureza fibrilar e estrutura tridimensional altamente organizada. Essa característica o torna adequado para técnicas de RMN de estado sólido. Conforme demonstrado na figura 15, foram realizadas análises de RMN de ¹³C comparativas entre o colágeno extraído da pele de tilápia e o colágeno bovino comercial (Figura 15, a e b, respectivamente).

Figura 15 - Espectro de RMN de sólido de ^{13}C das amostras de colágeno extraído da pele de tilápia (a) e colágeno comercial tipo I bovino (b).



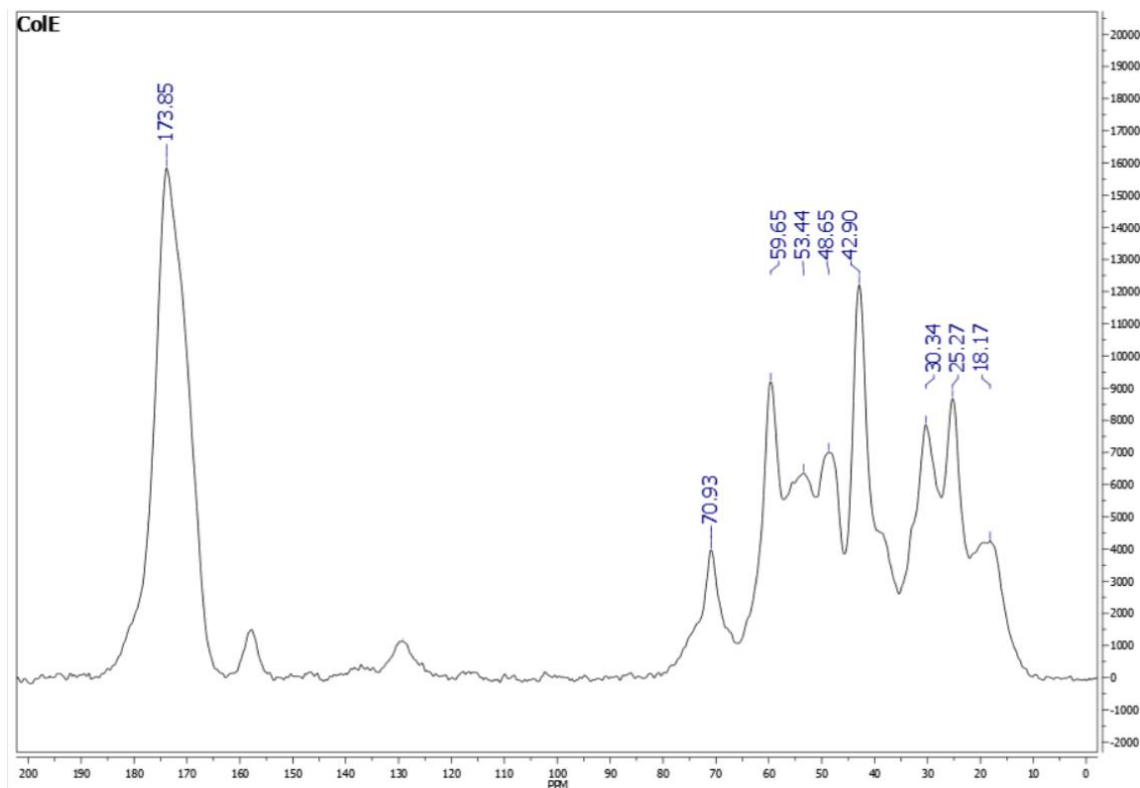
Fonte: autoria própria.

Os espectros obtidos apresentam similaridade qualitativa, com a maioria dos sinais sobrepostos. Tanto no colágeno tipo I comercial quanto na amostra de ColE, observam-se os sinais dos principais aminoácidos da cadeia polipeptídica de colágeno e seus respectivos deslocamentos químicos. A integridade estrutural é confirmada pela presença e posicionamento consistente dos picos característicos desses aminoácidos, alinhados com os dados da literatura (Tiwari et al., 2021).

A análise das posições dos picos confirma a integridade estrutural do colágeno. O espectro de ColE revela picos característicos dos aminoácidos predominantes em sua cadeia polipeptídica, como glicina (Gly), prolina (Pro), hidroxiprolina (Hyp) e alanina (Ala). Os deslocamentos químicos observados (Figura 16) incluem: 70,93 ppm (Hyp $C\gamma$), 59,65 ppm (Pro $C\alpha$ e Hyp $C\alpha$), 48,65 (Ala $C\alpha$ e Pro $C\delta$) 42,90 ppm (Gly $C\alpha$), 38,29 ppm (Hyp $C\beta$), 30,34 ppm (Pro $C\beta$), 25,27 ppm (Pro $C\gamma$) e 18,17 ppm (Ala $C\beta$). O sinal em 71,1 ppm (Hyp $C\gamma$) é uma impressão digital característica do colágeno (Saitô et al., 1992). A correspondência dos deslocamentos químicos com os do colágeno Tipo I comercial

confirma que o biomaterial analisado é predominantemente constituído por colágeno Tipo I, validando sua integridade estrutural e identidade molecular.

Figura 16 – Espectro de RMN ^{13}C da amostra de colágeno no estado sólido extraído da pele de tilápia.



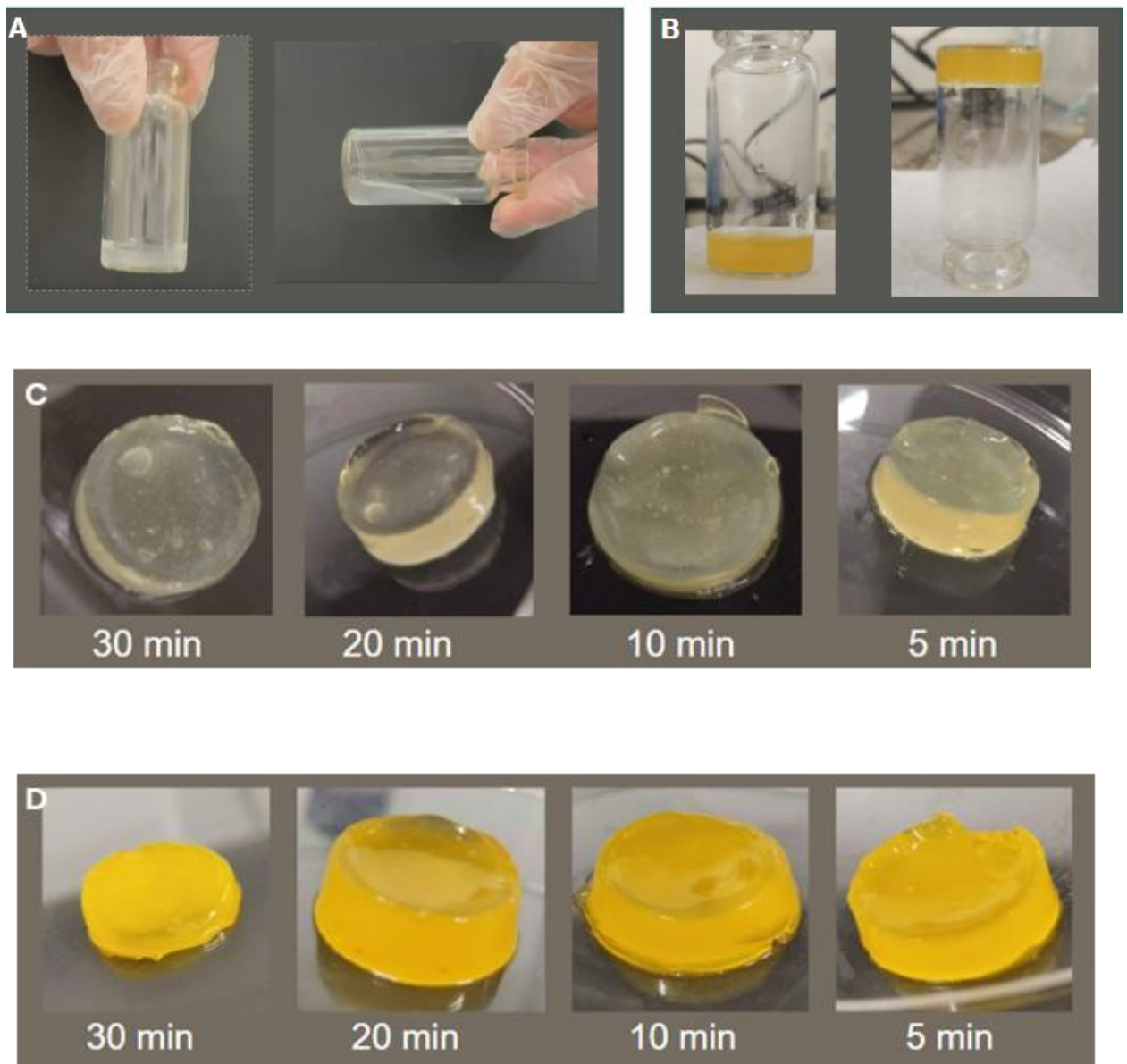
Fonte: autoria própria.

5.4 RETICULAÇÃO DO COLÁGENO

O colágeno puro, embora amplamente utilizado em aplicações biomédicas, apresenta limitações significativas, como a rápida degradação e a baixa resistência mecânica. Para superar esses desafios, foi empregada a técnica de reticulação do colágeno, um processo fotossensibilizado pela riboflavina e subsequente exposição à luz de LED azul. Os hidrogéis de colágeno foram preparados a partir da mistura de uma solução neutralizada de colágeno com soluções de riboflavina nas concentrações de 0,1% e 1,0%, seguidas de exposição à luz de LED azul por diferentes intervalos de tempo (5, 10, 20 e 30 minutos). A figura 17 ilustra uma comparação entre uma solução de colágeno sem reticulação (A) e uma amostra de colágeno reticulado com 1,0% de riboflavina e 30 minutos de exposição à luz (B). Adicionalmente, as imagens fotográficas (C) e (D) apresentam os hidrogéis reticulados, em diferentes tempos de

exposição à luz LED azul (5, 10, 20 e 30 minutos) nas concentrações de riboflavina de 0,1% e 1,0%, respectivamente.

Figura 17 – Solução de colágeno extraído da pele de tilápia sem reticulação (A). Colágeno extraído reticulado por 30 minutos com solução 1,0% de riboflavina (B). Hidrogéis de colágeno reticulados com solução de riboflavina 0,1% nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos (C). Hidrogéis de colágeno reticulados com solução de riboflavina 1,0% nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos (D).



Fonte: Autoria própria.

Os hidrogéis de colágeno formados demonstraram uma estrutura tridimensional coesa e homogênea, sem apresentar diferenças qualitativas macroscópicas evidentes em relação à forma ou integridade estrutural. No entanto, observou-se uma distinção visível na coloração das amostras, dependendo da concentração de riboflavina utilizada. A solução com 1,0% de riboflavina resultou em um hidrogel de tonalidade laranja escuro translúcido, enquanto a solução com 0,1% de riboflavina produziu um hidrogel de coloração amarelo claro translúcido. Essa variação na coloração pode ser atribuída à maior concentração de riboflavina, que pode estar presente no material, mesmo após a exposição a luz de LED azul.

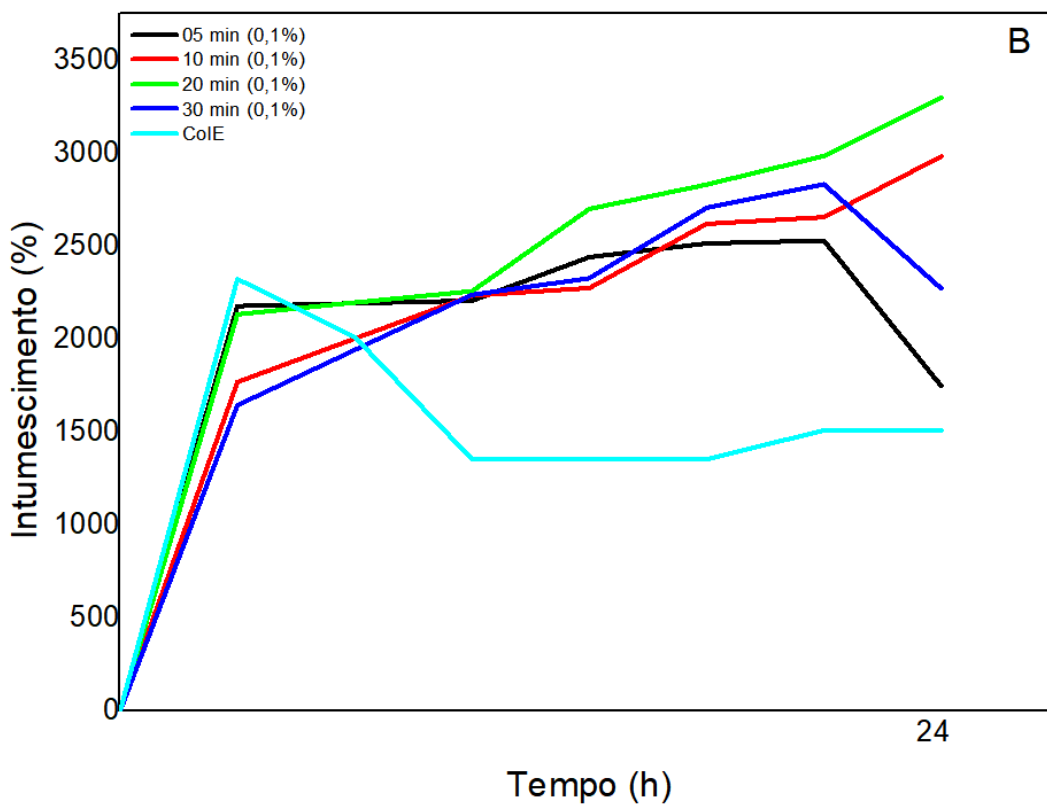
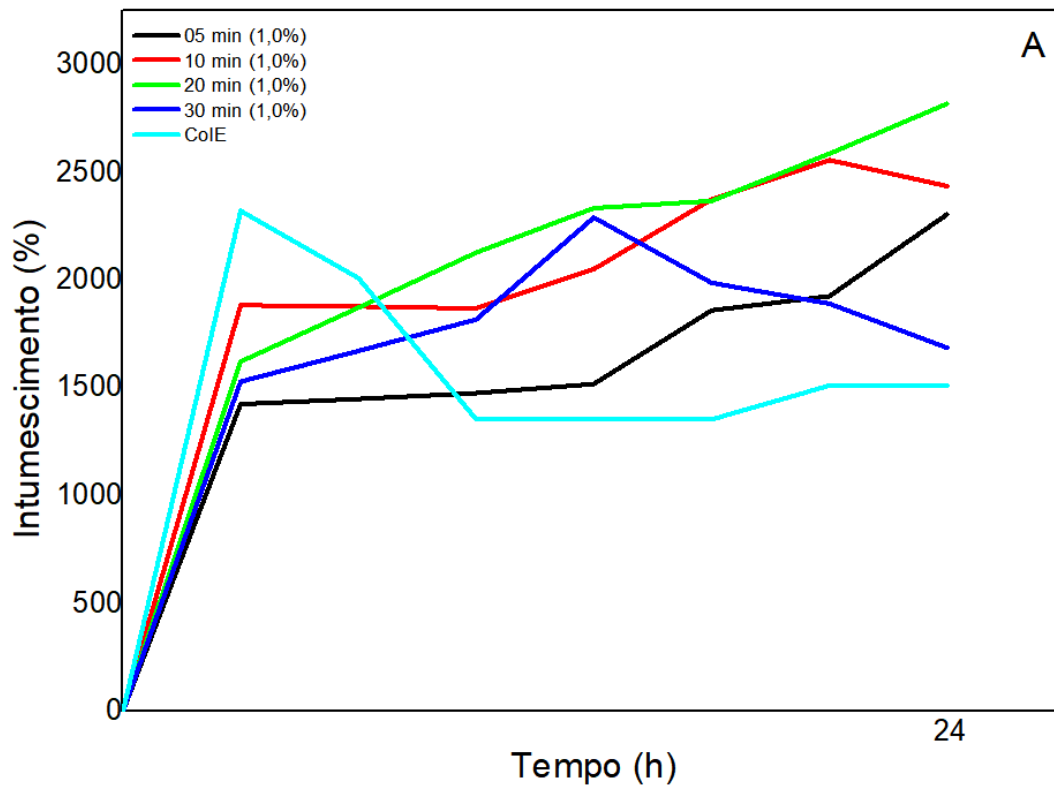
A riboflavina atua como um agente fotossensibilizador, sendo essencial para o processo de fotorreticulação. Quando exposta à luz com comprimento de onda entre 320 e 400 nm, induz a geração de espécies reativas de oxigênio, como radicais livres. Esses radicais promovem a formação de ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos presentes nas fibrilas de colágeno, resultando na criação de uma rede polimérica reticulada e mecanicamente estável (Heo et al., 2016). Além disso, a formação das fibrilas de colágeno é fortemente influenciada pelo pH do meio. A neutralização da solução de colágeno, realizada por meio da adição de uma solução de neutralização, promove a auto-organização das moléculas de colágeno em fibrilas. Esse passo é crucial para garantir a integridade estrutural do hidrogel antes da reticulação.

5.4.1 Teste de intumescimento

Um parâmetro fundamental a ser investigado em materiais destinados à engenharia de tecidos é a capacidade de absorção de fluidos biológicos e retenção de água, características que facilitam o transporte de metabólitos e nutrientes essenciais. Em contraponto, uma alta taxa de absorção de fluidos pode comprometer a estabilidade estrutural do polímero, acelerar sua degradação e aumentar a vulnerabilidade ao ataque microbiano. O grau de intumescimento do material é influenciado pelo nível de reticulação da rede polimérica, pela densidade das ligações cruzadas e pela interação entre o polímero e o solvente (LEE et al, 2001).

Com o objetivo de aprimorar as propriedades mecânicas e aumentar a resistência à degradação em condições fisiológicas, o colágeno extraído foi submetido à reticulação com soluções de riboflavina, conforme descrito anteriormente. A figura 18 apresenta os dados de intumescimento dos hidrogéis reticulados com soluções de riboflavina a 0,1% e 1,0%, expostos a diferentes tempos de luz azul.

Figura 18 - Taxa de intumescimento dos hidrogéis reticulados em diferentes tempos de exposição à luz azul, com solução de riboflavina de concentração (A) 1,0% e (B) 0,1%.



Fonte: autoria própria.

Os hidrogéis de colágeno reticulado (ColR) demonstraram propriedades de intumescimento distintas quando comparados ao colágeno não reticulado (ColE), conforme evidenciado na Figura 18. Observou-se que os hidrogéis reticulados com solução de riboflavina a 1,0% em todos os tempos de exposição à luz LED azul, bem como aqueles reticulados com solução a 0,1%, exibiram menor grau de intumescimento nas primeiras horas de ensaio em relação ao ColE. Esse comportamento era esperado, uma vez que a reticulação promove a formação de uma rede polimérica mais estruturada, reduzindo a capacidade de absorção de fluidos pela matriz.

Enquanto o ColE apresentou um intumescimento rápido na primeira hora de incubação, seguido por uma diminuição devido à perda de massa por solubilização, os hidrogéis de ColR mantiveram uma absorção gradual sem comprometimento significativo de sua integridade estrutural. Notavelmente, os hidrogéis reticulados com riboflavina a 1,0% exibiram menor intumescimento em comparação aos de 0,1%, indicando uma maior densidade de ligações cruzadas e, conseqüentemente, uma menor capacidade de absorção de solvente. Entre as amostras analisadas, o hidrogel ColR 1,0% exposto à luz azul por 5 minutos apresentou o menor grau de intumescimento, sugerindo uma reticulação mais eficiente nessa condição.

Entretanto, hidrogéis expostos por 30 minutos em ambas as concentrações exibiram um pico inicial de intumescimento, seguido por perda de massa nas horas subsequentes, indicativo de possível degradação progressiva do material. Esse comportamento sugere que tempos prolongados de fotoexposição podem comprometer a estabilidade da matriz reticulada.

O grau de intumescimento de materiais fotoativados de colágeno estão em concordância com os valores reportados por Brudzyńska et al. (2024), que descreveram graus de intumescimento variando entre 100 e 1000% para filmes de colágeno reticulado, dependendo do grau de reticulação.

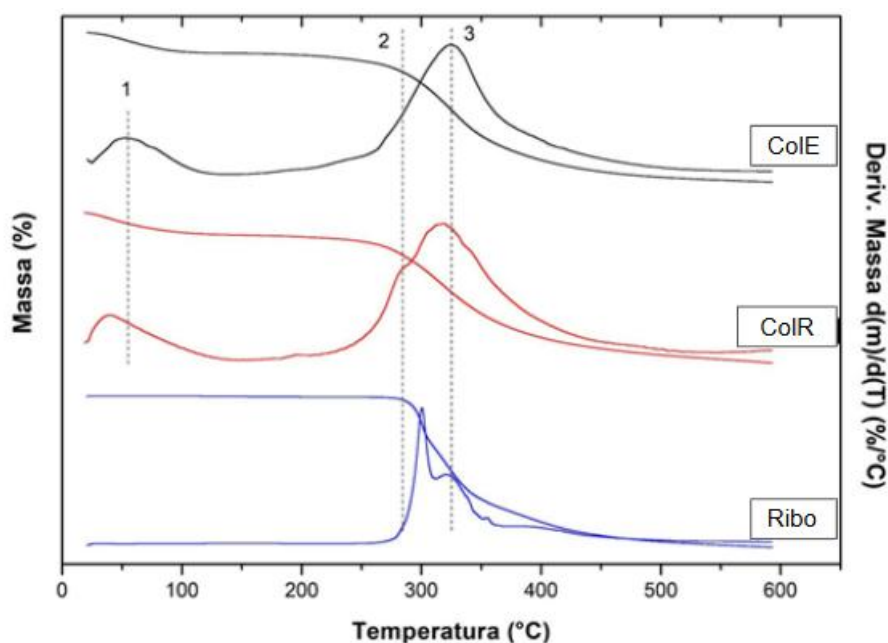
O ensaio de intumescimento constitui um método indireto para avaliar a eficiência da reticulação, uma vez que redes poliméricas mais densas, resultantes de maior número de ligações cruzadas, apresentam menor capacidade de absorção de solvente (Deméter et al., 2022). Dessa forma, os dados obtidos corroboram que os hidrogéis reticulados com riboflavina a 1,0%, particularmente aqueles submetidos a 5 minutos de fotoexposição,

apresentaram maior densidade de reticulação, refletida em sua menor taxa de intumescimento. Esses achados reforçam a hipótese de que o tempo de irradiação e a concentração de riboflavina são parâmetros críticos para modular as propriedades físico-químicas do colágeno reticulado, com implicações diretas em sua aplicação como biomaterial.

5.5 TERMOGRAVIMETRIA

As curvas termogravimétricas das amostras ColE, ColR e riboflavina foram obtidas e estão representadas na figura 19, enquanto os valores dos eventos térmicos correspondentes a cada amostra são detalhados na Tabela 3.

Figura 19 - Curvas TG e DTG das amostras colágeno extraído da pele de tilápia, colágeno extraído reticulado com solução de riboflavina 1,0% por 30 minutos e Riboflavina.



Fonte: autoria própria.

A análise da amostra ColE revelou a ocorrência de duas etapas distintas de perda de massa. A primeira etapa, observada entre 20 e 140 °C, apresenta um T_{onset} de 36 °C e um T_{max} de 53 °C, com uma perda de massa aproximada de 10%, atribuída à eliminação de umidade. A segunda etapa, que ocorre entre 210 e 480 °C, exibe um T_{onset} de 286 °C e um T_{max} de 325 °C, com uma perda de massa de cerca de 60%, associada à degradação das moléculas de ColE, resultando na fragmentação de componentes orgânicos e formação de compostos gasosos (Salvatore et al., 2020).

No caso da riboflavina, foram identificadas três etapas de perda de massa. A etapa principal ocorre na faixa de 250 a 350 °C, com um T_{onset} de 292 °C, e é caracterizada por duas subetapas: a primeira com T_{max} em 300 °C e a segunda com T_{max} em 320 °C. Essas etapas estão relacionadas à formação de álcool, etileno e acetaldeído. Acima de 350 °C, ocorre a terceira etapa, associada à degradação da flavina, com formação de CO₂, fenol e, finalmente, carvão (Ahmad et al., 2015).

Já as amostras de ColR exibiram três etapas de perda de massa. A primeira, entre 25 e 140 °C, apresenta um T_{onset} média de 25 °C e um T_{max} média de 37 °C, com uma perda de massa média de aproximadamente 6%, também atribuída à eliminação de umidade. A segunda etapa manifesta-se como um "ombro" adjacente ao pico principal, com T_{onset} médio em 279 °C e T_{max} médio em 293 °C, possivelmente relacionada à presença de riboflavina. A terceira etapa, com T_{max} médio em 321 °C, está associada à degradação do colágeno, processo que resulta na fragmentação de componentes orgânicos e formação de compostos gasosos. Adicionalmente, nesta etapa, pode ocorrer simultaneamente a transformação das moléculas de riboflavina em álcool, etileno e acetaldeído.

Tabela 3 – Valores de T_{onset} , T_{max} e perda de massa (%) para as amostras de colágeno extraído da pele de tilápia, colágeno extraído reticulado com solução de riboflavina 0,1% e 1,0% em diferentes tempos e Riboflavina.

Amostra	Evento	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	Perda de massa
ColE	1	36	53	10
	2	286	325	60
Riboflavina	1	292	300	76
	2	-	320	-
ColR 1,0% 20 min	1	23,3	33,6	3,8
	2	281	292,1	48,2
	3	-	320,6	-
ColR 0,1% 20 min	1	28,3	40	9,7
	2	283,6	295,2	45
	3	-	320,5	-
ColR 1,0% 5 min	1	24,8	36,3	2,8
	2	276	287,7	-
	3	-	320,8	64,1
ColR 0,1% 5 min	1	23,6	36,8	7,4
	2	275,8	295,1	73
	3	-	323,5	-

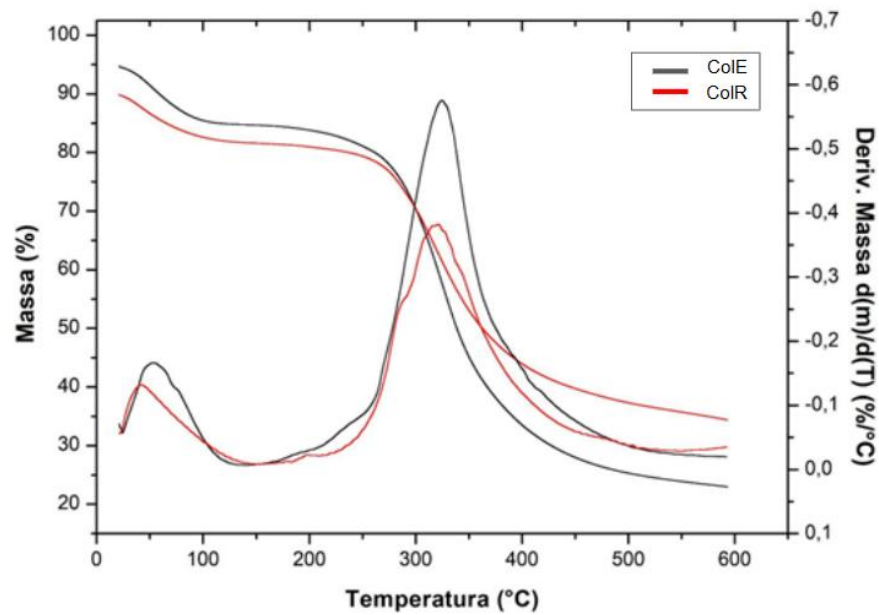
Fonte: autoria própria.

Neste estudo, observou-se que os termogramas da amostra de ColE apresentam grande semelhança com os das amostras de ColR, indicando comportamentos térmicos comparáveis. No entanto, a perda de massa do ColR foi substancialmente menor em relação ao ColE não reticulado, conforme demonstrado na Tabela 3. Essa redução na perda de massa sugere que a reticulação do ColE com a riboflavina promove um aumento na estabilidade térmica do material. Resultados semelhantes foram reportados por Sommer et al. (2021), em compostos de colágeno e celulose reticulados enzimaticamente. A reticulação, portanto, não apenas modifica a estrutura molecular do colágeno, mas também influencia diretamente sua resposta térmica, reduzindo a taxa de degradação e aumentando a integridade do material sob condições de aumento de temperatura.

As amostras reticuladas com soluções de riboflavina nas concentrações de 1,0% e 0,1%, submetidas a diferentes tempos de exposição à luz LED azul, também foram analisadas por termogravimetria (TG) com o objetivo de avaliar a influência da concentração de riboflavina e do tempo de exposição nos eventos térmicos. Conforme demonstrado na Tabela 3, a variação na concentração de riboflavina não exerceu um impacto expressivo sobre os eventos térmicos observados. No entanto, a perda de massa nos hidrogéis reticulados por 20 minutos em ambas as concentrações foi menor, indicando que o maior tempo de exposição à luz LED azul promove um aumento na estabilidade térmica.

Outro aspecto relevante observado foi a intensidade do pico na curva DTG (Figura 20). A amostra de ColR exibiu uma redução na intensidade do pico em comparação ao ColE, indicando que o processo de degradação do ColE torna-se menos intenso após a reticulação com a riboflavina. Esse fenômeno demonstra que a reticulação com a riboflavina não apenas aumenta a estabilidade térmica, mas também diminui a intensidade da degradação (Wang et al., 2017).

Figura 20 - Curvas TG e DTG para as amostras de colágeno extraído da pele de tilápia e colágeno extraído fotorreticulado com solução de riboflavina 1,0% por 20 minutos.

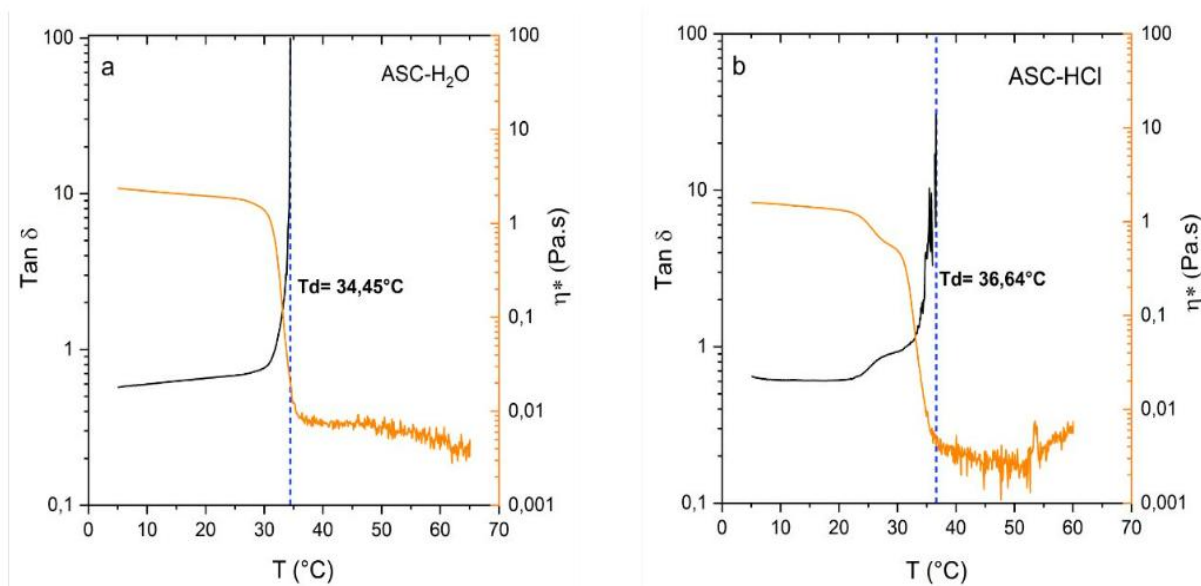


Fonte: Autoria própria.

5.6 ENSAIOS REOLÓGICOS

A análise reológica foi feita para determinar a temperatura de desnaturação do colágeno extraído. A figura 21 apresenta os resultados encontrados para as amostras de ColE solubilizado em HCl (0,01M) e intumescido em água nas concentrações de 6 mg.mL^{-1} para ambas as amostras.

Figura 21 - Curvas de tan delta e viscosidade complexa em função da temperatura para soluções de colágeno. (a) colágeno extraído intumescido em água a 6 mg.ml^{-1} e (b) solução em HCl (0,01M) de colágeno extraído a 6 mg.ml^{-1} .



Fonte: Autoria própria.

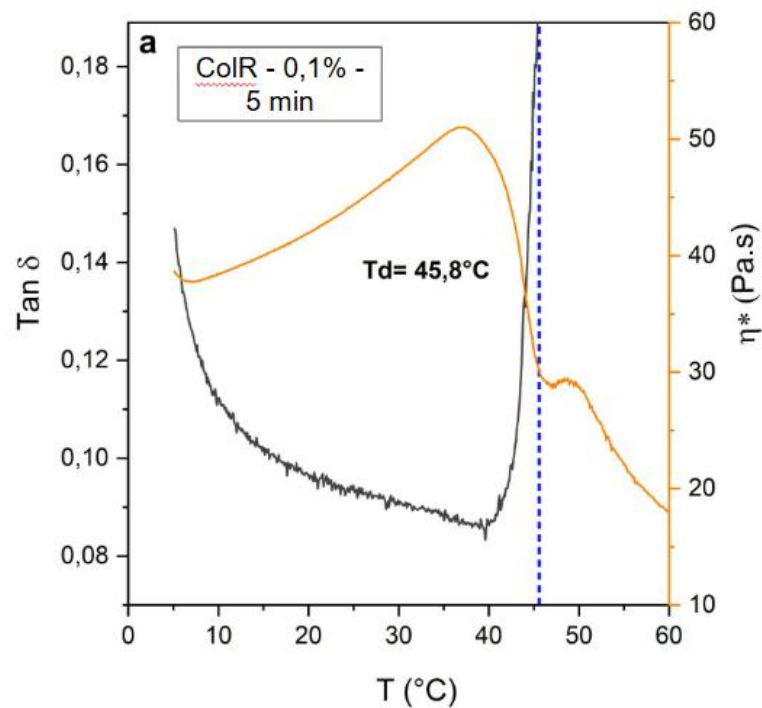
A temperatura de desnaturação pode ser determinada através dos parâmetros de viscosidade complexa e/ou $\tan \delta$ ($\tan \delta = G''/G'$). Neste caso, quando a viscosidade cai para aproximadamente 50% do valor inicial, as cadeias de colágeno começam a relaxar devido ao aumento da temperatura, ganhando maior liberdade de movimento e aproximando-se do estado líquido. Em relação ao parâmetro $\tan \delta$, a temperatura de desnaturação seria a que o valor de $\tan \delta$ atingiria o máximo. Neste parâmetro, seus valores aumentam com o aumento da temperatura, pois os valores de G'' (módulo de perda) aumentam em relação aos valores de G' (módulo de armazenamento). Como G'' está diretamente relacionado ao valor de $\tan \delta$, um aumento em G'' resulta em um aumento em $\tan \delta$, indicando que o material está em estado líquido. Portanto, atingir o estado líquido, é um indicativo da desnaturação das cadeias do colágeno (Núñez Carrero et al, 2022).

As temperaturas obtidas nas análises estão alinhadas com os resultados relatados na literatura para a temperatura de desnaturação (T_d) do ColE em que Song et al. (2018) mencionaram valores de T_d em torno de $36,80^\circ\text{C}$ para o ColE, muito próxima aos valores encontrados para o colágeno tanto solubilizado em ácido quanto em água. A temperatura de desnaturação está diretamente associada à composição de aminoácidos da cadeia polipeptídica, assim como à região helicoidal, que mantém a estrutura do colágeno compacta e ordenada. Em

outras palavras, a quantidade e a composição dos aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica influenciam diretamente sua estabilidade térmica (Song et al., 2021).

As amostras de colágeno reticulado (ColR) com soluções de riboflavina de 0,1% e 1,0% em tempos de 5 e 20 minutos também foram avaliadas por reologia. Conforme ilustrado na figura 22 e na tabela 4, as amostras apresentaram uma temperatura de desnaturação (T_d) média de aproximadamente 45 °C, valor consideravelmente mais elevado que o do colágeno extraído (ColE). Esse incremento na T_d sugere que a reticulação com riboflavina resultou em uma estrutura molecular mais organizada e termicamente estável. A maior estabilidade térmica pode ser explicada pelas ligações covalentes adicionais formadas durante o processo, que inibem a desnaturação das fibras, conferindo ao material maior resistência e durabilidade sob temperaturas elevadas (Adamiak et al., 2020).

Figura 22 – Curva de tan delta e viscosidade complexa em função da temperatura para o colágeno fotorreticulado com riboflavina.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Temperatura de desnaturação do colágeno reticulado com solução de riboflavina 0,1% e 1,0% em diferentes tempos de exposição a luz de azul.

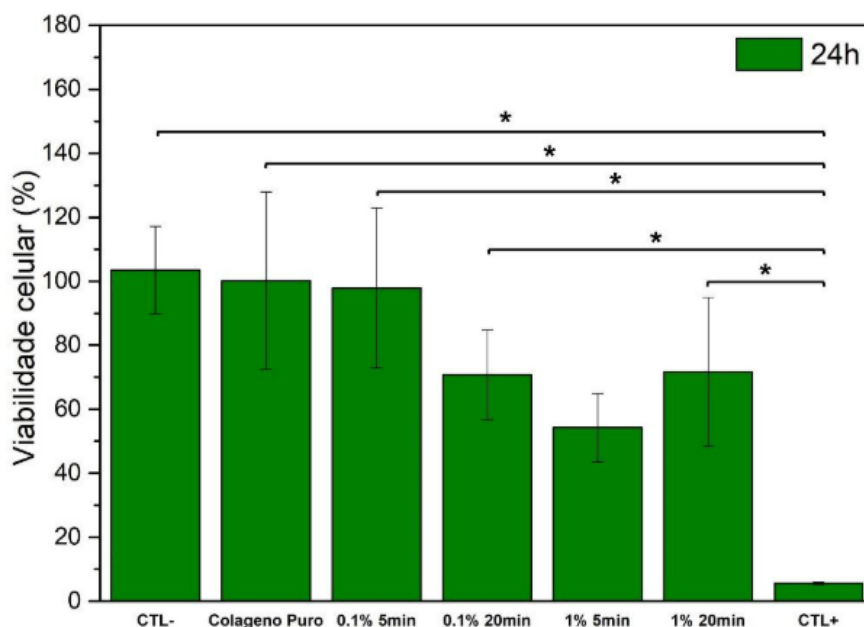
COLÁGENO RETICULADO (riboflavina)	η^* - 25°C (Pa.s)	Tan δ 25°C	T_d (°C)	η_{T_d} (Pa.s)	Tan δ_{T_d}
ColR 0,1%-5 min	44,4307	0,093033 9	45,82	29,6197	0,209611
ColR 0,1%-20 min	26,9481	0,109790	45,52	22,3756	0,146759
ColR 1,0%-5 min	38,9661	0,055653 7	44,97	32,1982	0,0810136
ColR 1,0%-20 min	15,4602	0,059086 5	43,84	14,9883	0,111917

Ao comparar as amostras de ColR soluções de riboflavina nas concentrações de 0,1% e 1,0%, submetidas a diferentes tempos de exposição à luz azul, não foram observadas diferenças significativas nos valores de T_d. Esse resultado sugere que, dentro das condições avaliadas, o tempo de exposição e as concentrações de riboflavina utilizadas não diferiram significativa a temperatura de desnaturação do colágeno reticulado.

5.8 ENSAIO DE CITOXICIDADE

A citotoxicidade das amostras de ColE, ColR 0,1% 5 min, ColR 0,1% 20 min, ColR 1,0% 5 min e ColR 1,0% 20 min foi comparada aos controles negativo (CTL-) e positivo (CTL+), sendo evidenciada na figura 23.

Figura 23 – Gráfico de viabilidade celular do grupo colágeno extraído da pele de tilápia, ColR 0,1% 5 min, ColR 0,1% 20 min, ColR 1,0% 5 min, ColR 1,0% 20 min.



Fonte: Autoria própria.

O controle negativo (CTL-) consiste em células semeadas diretamente na placa, enquanto o controle positivo (CTL+) corresponde às células submetidas à morte. O nível de significância entre os grupos é expresso como $*p < 0,05$ no período de 24h. Com base nos resultados apresentados na figura 23, constatou-se que as amostras de ColE, ColR 0,1% 5 min, ColR 0,1% 20 min, ColR 1,0% 5 min e ColR 1,0% 20 min apresentaram viabilidades celulares de aproximadamente 100%, 98%, 71%, 54% e 72%, respectivamente. Ao serem comparadas ao controle negativo (CTL-), que apresentou viabilidade de 103%, não houve diferença estatisticamente significativa, indicando a ausência de citotoxicidade em todas as condições testadas. Por outro lado, em relação ao controle positivo (CTL+), cujas células foram submetidas à indução de morte, todas as amostras ColE, ColR 0,1% - 5 min, ColR 0,1% - 20 min, ColR 1,0% - 20 min, incluindo o CTL-, exibiram uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Exceto a amostra de ColR 1,0% - 5 min que não apresentou diferença estatística significativa com o CTL+. Isso pode ser explicado devido a concentração de riboflavina contida

na amostra (1,0%) e o pouco tempo de exposição à luz azul para a reticulação, fazendo com que a riboflavina seja liberada com mais facilidade. No geral, esses achados confirmam que tanto o colágeno quanto às concentrações e tempos de reticulação da riboflavina (0,1% - 5 min, 0,1% - 20 min, 1,0% - 5 min e 1,0% - 20 min) não impactaram negativamente a viabilidade celular.

De acordo com Majeed et al. (2024), o colágeno extraído da pele de carpa demonstrou excelente biocompatibilidade em 24 horas, evidenciando seu potencial como biomaterial. De forma semelhante, Preda et al. (2021) observaram que o colágeno obtido da pele de carpa cinza também não apresentou citotoxicidade no período de 24 horas. Adicionalmente, Ge et al. (2020) relataram que o colágeno derivado da pele de tilápia é um biomaterial altamente promissor para aplicações em engenharia tecidual dérmica. Além de não exibir citotoxicidade *in vitro*, o material promoveu, *in vivo*, uma cicatrização acelerada de feridas profundas causadas por queimaduras de segundo grau, atuando como um curativo dérmico eficiente.

A riboflavina, por sua vez, é reconhecida como uma vitamina B2 biologicamente ativa, desempenhando um papel crucial na atividade enzimática e participando de reações redox essenciais para o metabolismo energético de células aeróbicas (Beztsinna et al., 2016). Heo et al. (2016) desenvolveram um colágeno fotorreticulado com riboflavina para aplicações em engenharia tecidual de menisco, obtendo resultados satisfatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com destaque para a viabilidade celular, proliferação e migração de fibrocondrócitos. Além disso, estudos clínicos utilizando riboflavina como agente reticulante de colágeno corneano para o tratamento de ceratocone demonstraram uma melhora significativa na progressão da doença (Legare et al., 2013).

Dessa maneira, o colágeno reticulado com riboflavina demonstrou ser um biomaterial altamente promissor, destacando-se pelo seu grande potencial para uma ampla gama de aplicações biomédicas. Ademais, suas propriedades o tornam uma excelente alternativa para avanços na engenharia tecidual e em estratégias inovadoras de regeneração de tecidos, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

6 CONCLUSÕES

O colágeno extraído da pele de tilápia foi caracterizado, e os resultados obtidos indicaram uma extração eficaz e um rendimento compatível com os valores encontrados na literatura. A análise por SDS-PAGE confirmou a preservação da estrutura nativa do colágeno, evidenciada pela presença de bandas correspondentes às massas moleculares características dessa proteína. A espectroscopia FTIR corroborou esses achados, identificando bandas típicas do colágeno, enquanto a RMN revelou picos correspondentes aos aminoácidos predominantes na cadeia polipeptídica. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou uma morfologia organizada em uma matriz tridimensional, composta por folhas interconectadas. A análise reológica indicou uma temperatura de desnaturação de aproximadamente 37°C para o colágeno solubilizado em ácido clorídrico, consistente com dados da literatura.

A fotorreticulação mediada por riboflavina resultou na formação de hidrogéis de colágeno que mantiveram sua integridade estrutural. A análise por FTIR não detectou alterações significativas nos espectros em função do tempo de exposição à luz azul, confirmando que a riboflavina atua na formação de ligações cruzadas sem modificar a estrutura da cadeia polimérica. O estudo de intumescimento revelou que os hidrogéis reticulados com 0,1% de riboflavina apresentaram maior taxa de intumescimento em comparação aos reticulados com 1,0%, sugerindo uma menor densidade de reticulação nas amostras com menor concentração de riboflavina. A análise termogravimétrica (TG) demonstrou maior estabilidade térmica nos hidrogéis expostos à luz LED azul por períodos mais prolongados, com menor perda de massa. A reologia indicou um aumento na temperatura de desnaturação para aproximadamente 44°C nos hidrogéis reticulados, corroborando a formação de ligações cruzadas que conferem maior resistência térmica.

A avaliação de citotoxicidade não evidenciou efeitos adversos significativos nas células expostas aos hidrogéis, independentemente da concentração de riboflavina ou do tempo de exposição à luz azul. Comparadas ao controle negativo (CTL-), todas as amostras mantiveram viabilidade celular, sem diferenças estatisticamente significativas. Em relação ao controle positivo (CTL+), observou-se uma diferença ($p < 0,05$), com maior liberação de riboflavina no meio em tempos menores de exposição, sem, contudo, comprometer a viabilidade celular.

Dessa forma, o colágeno extraído da pele de tilápia apresentou características físico-químicas e estruturais adequadas para aplicações biomédicas, com rendimento e pureza

compatíveis com os padrões da literatura. A técnica de fotorreticulação mediada por riboflavina mostrou-se eficaz na formação de hidrogéis de colágeno com propriedades mecânicas e térmicas aprimoradas, sem comprometer a biocompatibilidade do material. A ausência de citotoxicidade e a manutenção da viabilidade celular reforçam o potencial desses hidrogéis para uso em engenharia tecidual e outras aplicações biomédicas. Além disso, a maior estabilidade térmica e a resistência mecânica observadas nos hidrogéis reticulados sugerem que o processo de fotorreticulação pode ser ajustado para atender a demandas específicas para regeneração tecidual ou sistemas de liberação controlada de fármacos. Futuros estudos podem explorar a otimização das condições de reticulação e a avaliação *in vivo* desses materiais, visando a aplicação clínica e a validação de sua eficácia e segurança em modelos biológicos mais complexos.

REFERÊNCIAS

- ABDSHAHZADEH, H., ABRISHAMCHI, R., AYDEMIR, M. E., HAFEZI, N., HILLEN, M., TORRES-NETTO, E. A., Lu, N.-J., HAFEZI, F. Repeated application of riboflavin during corneal cross-linking does not improve the biomechanical stiffening effect ex vivo. **Experimental Eye Research**, 224, 109267, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109267>
- ADAMIAK, K., SIONKOWSKA, A. Current methods of collagen cross-linking: Review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 161, 550–560, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075>
- AHMAD, N., ALAM, M., AL-OTAIBI, M. A. N. Thermal decomposition and kinetic studies of solid riboflavin using model-free methods. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, 40(1), 86–94, 2015. <https://doi.org/10.3184/146867815X14212355041033>
- ANAL, A. K., NOOMHORM, A., VONGSAWASDI, P. Protein hydrolysates and bioactive peptides from seafood and crustacean waste: Their extraction, bioactive properties and industrial perspectives. Em S. Kim (Org.), **Marine Proteins and Peptides** (1o ed, p. 709–735), 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118375082.ch36>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10004:2004**. Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.
- BARROSO, R. M., MUÑOZ, A. E. P., TAHIM, E. F., WEBBER, D. C., ALBUQUERQUE FILHO, A. da C., PEDROZA FILHO, M. X., TENÓRIO, R. A., CARMO, F. J. do, BARRETO, L. E. G. de S., MUEHLMANN, L. D., SILVA, F. M., HEIN, G. Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2018. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1090301>
- BEZTSINNA, N., SOLÉ, M., TAIB, N., BESTEL, I. Bioengineered riboflavin in nanotechnology. **Biomaterials**, 80, 121–133, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.050>
- BHAGWAT, P. K., DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 7, 234–240, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.010>

BREBU, M., DUMITRIU, R. P., PAMFIL, D., BUTNARU, E., STOLERU, E. Riboflavin mediated UV crosslinking of chitosan-gelatin cryogels for loading of hydrophobic bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, 324, 121521, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121521>

DARVISH, D. M. Collagen fibril formation in vitro: From origin to opportunities. **Materials Today Bio**, 15, 100322, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100322>

DEMETER, M.; CĂLINA, I.; SCĂRIȘOREANU, A.; MICUTZ, M.; KAYA, M.A. Correlations on the Structure and Properties of Collagen Hydrogels Produced by E-Beam Crosslinking. **Materials** 2022, 15, 7663. <https://doi.org/10.3390/ma15217663>

ELMASSRY, Rania M. et al. Photocrosslinked collagen-based hydrogels for corneal repair. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 5, p. 1234-1245, 2020.

ELMASSRY, A., SAID AHMED, O. I., ABDALLA, M. F., GABALLAH, K. Ten years experience of corneal collagen cross-linking: An observational study of 6120 cases. **European Journal of Ophthalmology**, 31(3), 951–958, 2021. <https://doi.org/10.1177/1120672120928921>

FAO. In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO, 2022. <https://doi.org/10.4060/cc0463en>.

FRANK-KAMENETSKAYA, O. V., VLASOV, D. Yu., PANOVA, E. G., LESSOVAIA, S. N. Processes and phenomena on the boundary between biogenic and abiogenic nature. **Springer International Publishing**. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21614-6>

GAIKWAD, S., KIM, M. J. Fish by-product collagen extraction using different methods and their application. **Marine Drugs**, 22(2), 60, 2024. <https://doi.org/10.3390/md22020060>.

GALLO, N.; NATALI, M.L.; QUARTA, A.; GABALLO, A.; TERZI, A.; SIBILLANO, T.; GIANNINI, C.; DE BENEDETTO, G.E.; LUNETTI, P.; CAPOBIANCO, L.; et al. Aquaponics-Derived Tilapia Skin Collagen for Biomaterials Development. **Polymers**, v. 14, n. 9, 1865, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14091865>.

GE, B. et al. Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. *Marine Drugs*, v. 18, n. 4, p. 178, 2020. DOI: 10.3390/md18040178.

GUILLÉN-CARVAJAL, K., VALDEZ-SALAS, B., BELTRÁN-PARTIDA, E., SALOMÓN-CARLOS, J., CHENG, N. Chitosan, gelatin, and collagen hydrogels for bone regeneration. *Polymers*, v. 15, n. 13, 2762, 2023. <https://doi.org/10.3390/polym15132762>

HEO, J., KOH, RH, SHIM, W. et al. Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 6 , 148–158, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0224-4>

INSIŃSKA-RAK, M., Henke, P., BREITENBACH, T., OGILBY, P. R. Singlet oxygen quenching by riboflavin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 446, 115108, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2023.115108>.

ISO 10993-5 (E): Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, (2009).

ISO 10993-12 (E): Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials, (2012).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Berlin, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEALI, P.T., Merolli, A. Fundamentals of Biomaterials. In: Merolli, A., Joyce, T.J. (eds) **Biomaterials in Hand Surgery**. Springer, Milano, 2009. https://doi.org/10.1007/978-88-470-1195-3_1

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, n. 1-2, p. 1-22, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3).

LEGARE, M. E. et al. Corneal collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet A for the treatment of mild to moderate keratoconus: 2-year follow-up. *Canadian Journal of Ophthalmology*, v. 48, n. 1, p. 63-68, 2013. DOI: 10.1016/j.jcjo.2012.11.007.

LIU, D., LIANG, L., REGENSTEIN, J. M., ZHOU, P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v.133 n. 4, 1441–1448, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.032>.

KANG, Y., KIM, J. H., KIM, S. Y., KOH, W.-G., LEE, H. J. Blue light-activated riboflavin phosphate promotes collagen crosslinking to modify the properties of connective tissues. **Materials**, 14(19), 5788, 2021. <https://doi.org/10.3390/ma14195788>

KUBYSHKIN, V. Stabilization of the triple helix in collagen mimicking peptides. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 17(35), 8031–8047, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9OB01646E>

MAJEED, M. et al. Cytotoxicity and viability evaluation of collagen isolated from Rohu fish (*Labeo rohita*) skin waste. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, [S. l.], v. 0, n. 0, 2024. DOI: 10.1177/08839115241304741.

MAK, K. M., PNG, C. Y. M., LEE, D. J. Type v collagen in health, disease, and fibrosis. **The Anatomical Record**, 299(5), 613–629, 2016. <https://doi.org/10.1002/ar.23330>.

MATINONG, A.M.E.; CHISTI, Y.; PICKERING, K.L.; HAVERKAMP, R.G. Collagen Extraction from Animal Skin. **Biology**, 11, 905, 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11060905>.

MENEZES, M. D. L. L. R., RIBEIRO, H. L., ABREU, F. D. O. M. D. S., FEITOSA, J. P. D. A., FILHO, M. D. S. M. D. S. Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 189, 110852, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110852>

NÚÑEZ CARRERO, K.C.; VELASCO-MERINO, C.; ASENSIO, M.; GUERRERO, J.; MERINO, J.C. Rheological Method for Determining the Molecular Weight of Collagen Gels by Using a Machine Learning Technique. **Polymers**, 14, 3683, 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14173683>

OLFAT N, ASHOORI M, SAEDISOMEOLIA A. Riboflavin is an antioxidant: a review update. **British Journal of Nutrition**. 128(10):1887-1895, 2022. doi:10.1017/S0007114521005031

PAL, G. K., SURESH, P. V. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 37, 201–215, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.015>

PATIL, V. A., MASTERS, K. S. Engineered collagen matrices. **Bioengineering**, 7(4), 163, 2020. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040163>.

PEDROZA FILHO, M. X., RIBEIRO, V. S., ROCHA, H. S., UMMUS, M. E., VALE, T. M. do. Caracterização da cadeia produtiva da tilápia nos principais polos de produção do Brasil. **Embrapa**, 2020. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1125358>

PREDA, P. et al. Cytotoxicity evaluation and physicochemical properties of collagen isolated from silver carp tails as potential biomaterial. *Romanian Biotechnology Letters*, v. 26, n. 4, p. 2808-2817, 2021. DOI: 10.25083/rbl/26.4/2808.2817

RAISKUP, F; THEURING, A; PILLUNAT, L. E.; SPOERL, E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: Ten-year results. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 45, n. 3, p. 283-291, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2018.10.036>.

RAJABIMASHHADI, Z.; GALLO, N.; SALVATORE, L.; LIONETTO, F. Collagen Derived from Fish Industry Waste: Progresses and Challenges. *Polymers* 2023, 15, 544. <https://doi.org/10.3390/polym15030544>

RIAZ, T., ZEESHAN, R., ZARIF, F., ILYAS, K., MUHAMMAD, N., SAFI, S. Z., REHMAN, I. U. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.53 n.9, 703–746, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>

RIBEIRO, V. S., PEDROZA FILHO, M. X. Regional analysis of aquaculture value chain: Study of tilapia production zones in Brazil. **Aquaculture**, 551, 737948, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737948>

ROSSERT, J., DE CROMBRUGGHE, B. Type i collagen. **Em Principles of Bone Biology**, p. 189–XVIII. Elsevier, 2002. <https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1.50114-1>

RUCKER, R. B., MORRIS, J., FASCETTI, A. J. Vitamins. **Em Clinical Biochemistry of Domestic Animals** p. 695–730, 2008. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00023-4>

RÝGLOVÁ, Š.; BRAUN, M.; SUCHÝ, T. Collagen and its modifications - Crucial Aspects with concern to its processing and analysis. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 302, n. 6, 1600460, June 2017. DOI:10.1002/mame.201600460

SALVATORE, L., GALLO, N., AIELLO, D., LUNETTI, P., BARCA, A., BLASI, L., MADAGHIELE, M., BETTINI, S., GIANCANE, G., HASAN, M., BOROVKOV, V., NATALI, M. L., CAMPA, L., VALLI, L., CAPOBIANCO, L., NAPOLI, A., SANNINO, A. 2020. An insight on type I collagen from horse tendon for the manufacture of implantable devices. **International Journal of Biological Macromolecules**, 154, 291–306, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.082>

SANTHIAGO, M. R., RANDLEMAN, J. B. The biology of corneal cross-linking derived from ultraviolet light and riboflavin. **Experimental Eye Research**, 202, 108355, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108355>.

SATO, K., YOSHINAKA, R., SATO, M., ITOH, Y., SHIMIZU, Y. Isolation of types I and V collagens from carp muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 90(1), 155–158, 1988. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90053-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90053-3)

SIONKOWSKA, A., KULKA-KAMIŃSKA, K., BRUDZYŃSKA, P., LEWANDOWSKA, K., PIWOWARSKI, Ł. The influence of various crosslinking conditions of edc/nhs on the properties of fish collagen film. **Marine Drugs**, 22(5), 194, 2024. <https://doi.org/10.3390/md22050194>

SONG, Z., LIU, H., CHEN, L., CHEN, L., ZHOU, C., HONG, P., DENG, C. Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the Nile tilapia by fermentation and chemical pretreatment. **Food Chemistry**, 340, 128139, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128139>

SONG W-K, LIU D, SUN L-L, LI B-F, HOU H. Physicochemical and Biocompatibility Properties of Type I Collagen from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) for

Biomedical Applications. **Marine Drugs**, [s. l.] v. 17, no. 3: 137, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/md17030137>.

SUBRAMANIAN, D., TIAHJONO, N. S., HERNANDEZ, P. A., VARNER, V. D., PETROLL, W. M., SCHMIDTKE, D. W. Fabrication of Micropatterns of Aligned Collagen Fibrils. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, 40(5), 2551–2561, 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c02676>

SUN, L., LI, B., JIANG, D., HOU, H. Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 159, 89–96, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.061>

TANG, S. S., MOHAD, V., GOWDA, M., THIBEAULT, S. L. Insights into the role of collagen in vocal fold health and disease. **Journal of Voice**, 31(5), 520–527, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2017.01.008>

TIWARI, Nidhi; WI, Sungsool; MENTINK-VIGIER, Frederic; SINHA, Neeraj. Mechanistic insights into the structural stability of collagen-containing biomaterials such as bones and cartilage. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 125, n. 18, p. 4757-4766, 13 maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c01431>.

VAN DER REST, M., GARRONE, R. Collagen family of proteins. **The FASEB Journal**, 5(13), 2814–2823, 1991. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916105>

WANG, K., WANG, W., WU, X., XIAO, J., LIU, Y., LIU, A. Effect of photochemical UV/riboflavin-mediated cross-links on different properties of fish gelatin films. **Journal of Food Process Engineering**, 40(5), e12536, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12536>.

WALIMBE, T.; PANITCH, A. Best of Both Hydrogel Worlds: Harnessing Bioactivity and Tunability by Incorporating Glycosaminoglycans in Collagen Hydrogels. **Bioengineering**, 7, 156, 2020. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040156>.

WEADOCK, K., OLSON, R. M., SILVER, F. H. Evaluation of collagen crosslinking techniques. **Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs**, 11(4), 293–318, 1983. <https://doi.org/10.3109/10731198309118815>

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, 30(30), 5897–5909, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>

WOLLENSAK, G; SPOERL, E; SEILER, T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, v. 135, n. 5, p. 620-627, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)02220-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)02220-1).

YAMAMOTO, K.; YOSHIZAWA, Y.; YANAGIGUCHI, K.; IKEDA, T.; YAMADA, S.; HAYASHI, Y. The characterization of fish (Tilapia) collagen sponge as a biomaterial. **International Journal of Polymer Science**, London, v. 2015, 957385, 2015.

ZHANG, X., XU, S., SHEN, L. et al. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. *J Leather Sci Eng* 2, 19 (2020). <https://doi.org/10.1186/s42825-020-00033-0>

ZHENG, L., TSEOMASHKO, N., VORONOVA, A. et al. Recent advances of collagen composite biomaterials for biomedical engineering: Antibacterial functionalization and 3D-printed architecturalization. **Collagen and Leather**, 6, 22, 2024. <https://doi.org/10.1186/s42825-024-00164-8>.

ZOHORSKY, K., & MEQUANINT, K. Designing biomaterials to modulate notch signaling in tissue engineering and regenerative medicine. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 27(5), 383–410, 2021. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0182>.