



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA-MESTRADO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

FÁBIO LIMA CAVALCANTE

**SÍNTESE DE HIDROGEÍIS DE COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
PROVENIENTES DE SUB-PRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

FORTALEZA

2017

FABIO LIMA CAVALCANTE

SÍNTESE DE HIDROGEÍIS DE COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
PROVENIENTES DE SUB-PRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Esta dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Orientação: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa;

FORTALEZA

2017

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

- C364s Cavalcante, Fábio Lima.
Síntese de hidrogéis de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de sub-produtos da indústria avícola / Fábio Lima Cavalcante. – 2017.
60 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Morsyleide de Freitas Rosa.
1. Colágeno. 2. Queratina. 3. Hidrogel. 4. Bioapatita. I. Título.

CDD 540

FABIO LIMA CAVALCANTE

SÍNTESE DE HIDROGEÍIS DE COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
PROVENIENTES DE SUB-PRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Esta dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Orientação: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa;

Aprovada em: 16 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (Orientadora)

Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) - Agroindústria Tropical

Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho

Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) - Agroindústria Tropical

Profa. Dra. Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu (Externo)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho, pela amizade, dedicação e apoio no desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa, pela amizade, dedicação e apoio atribuídos a min e a este trabalho.

Ao Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos – LPT, pela acessibilidade e disponibilidade em realizar as análises de FTIR.

À Central Analítica da UFC, pela acessibilidade e disponibilidade na realização das análises de MEV.

À Lílían Chain Alexandre, Francisca Nunes e Natália Moura pela sua dedicação, zelo e cuidado com a organização do Laboratório, qualidades indispensáveis para a correta realização dos trabalhos.

Aos meus pais Maria Aparecida e Francisco de Souza, pela dedicação e empenho com o qual me conduziram até aqui.

À minha avó Dona Maria Perpétua, pelo zelo, amor e cuidado com o qual tem me conduzido desde a infância.

À minha companheira Hortência Cavalcante, pelo amor, paciência, empenho e carinho com o qual me auxiliou durante todo este processo.

Aos amigos e colegas Jackson, Menta, Celso, Edna, Edla, Neto, Avelino, Vanessa, Éden, André e Rayane, que sempre estiveram presentes e dispostos a compartilhar de seus conhecimentos, contribuindo imensamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Marcelo, Fabrício, Willy, Davi, Lenny, Emiliano, Mary, Muller e Jefferson pelo apoio e suporte prestados durante esta caminhada.

A UFC, ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao CNPq pela possibilidade de realização deste trabalho.

O passado não deve ser perseguido e o futuro não deve ser desejado; o que é passado está acabado e já foi e o futuro ainda está por vir.

(Buda Sidarta Gautama)

RESUMO

A pesquisa no campo da engenharia de tecidos tem se desenvolvido exponencialmente nos últimos anos, principalmente no que diz respeito a pesquisa com hidrogéis que visam mimetizar a matriz extracelular. Neste trabalho, investigou-se a formação de hidrogéis reticulados com riboflavina/UV a partir de biomateriais extraídos de subprodutos da indústria avícola, visando sua aplicação como matriz extracelular para reconstrução de tecido cartilaginoso. Todos os materiais de partida (peles, tendões, ossos e penas) foram caracterizados quanto a sua composição química (teor de lipídeos, proteínas, cinzas e umidade), em seguida foram submetidos a várias etapas de pré-tratamento visando a obtenção de produtos com grau de pureza adequado. Os biomateriais obtidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), tamanho de partícula e potencial Zeta. A nanoqueratina obtida apresentou tamanho médio de 167 nm e valor de potencial de - 32,4 mV, indicando boa estabilidade em suspensão. As bioapatitas obtidas apresentaram-se enquanto pós brancos de teor de carbonato variando entre 3,5-5%, relação Ca/P variando entre 1,5-4,5 e índices de cristalinidade de 85-95%, valores normalmente tidos como indicativos de bioatividade e biocompatibilidade. O colágeno obtido apresentou baixo teor de cinzas, efetividade nos procedimentos de purificação e absorções no espectro de FTIR que indicam a manutenção da tripla hélice, bem como temperatura de desnaturação de 40,5 °C, condizente com o reportado na literatura para colágeno obtido de peles de frango. Foi possível a obtenção de hidrogéis manipuláveis de colágeno, hidroxiapatita e nanoqueratina através de reticulação com riboflavina/UV. Os hidrogéis obtidos apresentaram distribuição aleatória de poros com tamanhos que variam de 50 a 380 μm , aumento da temperatura inicial de degradação resultante da efetiva reticulação e da adição de nanoqueratina à matriz de colágeno. Baseado nestes resultados é possível afirmar que os hidrogéis obtidos possuem potencial aplicabilidade no desenvolvimento de tecido cartilaginoso para implante.

Palavras-chave: Colágeno. Queratina. Hidrogel. Bioapatita.

ABSTRACT

Research in the field of tissue engineering has developed exponentially in the last years, mainly in what concerns the research with hydrogels that aim to mimic the extracellular matrix. This work aims to investigate the formation of riboflavin / UV cross-linked hydrogels from biomaterials extracted from poultry industry byproducts, aiming at their application as a mimetic extracellular matrix for the reconstruction of cartilaginous tissue. All starting materials (skin, tendons, bones and feathers) were characterized for their chemical composition, lipid, protein, ash and moisture contents, along with several pretreatment steps in order to obtain products with an appropriate degree of purity. The obtained biomaterials were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), particle size and Zeta potential. The obtained nanokeratin had an average size of 167 nm and a Zeta potential value of - 32.4 mV, indicating good stability in suspension. As bioapatites obtained were presented as posterior carbon content varying between 3.5-5%, Ca / P ratio ranging between 1.5-4.5 and crystal indices of 85-95%, values usually taken as indicatives of bioactivity and biocompatibility. The obtained collagen presented low ash content, effectiveness in the absorption and absorption procedures without FTIR spectra that indicate a triple maintenance, as well as the denaturation temperature of 40.5 ° C, in agreement with the report in the literature for collagen obtained from chicken skins. It was possible to obtain a preparation of hydrogels manipulating collagen, hydroxyapatite and nanokeratin through riboflavin / UV crosslinking. The obtained hydrogels presented a random distribution of pores with packages ranging from 50 to 380 μm , increasing the initial degradation temperature resulting from the effective crosslinking and the addition of nanokeratin to the collagen matrix. Based on these results it is possible to state that the hydrogels obtained have potential applicability in the development of cartilage tissue for implantation.

Keywords: Collagen. Keratin. Hydrogel. Bioapatite.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Indústria avícola	4
3.2	Colágeno	4
3.3	Queratina	6
3.4	Bioapatita	8
3.5	Hidrogéis	10
3.5.1	<i>Métodos de preparo de hidrogéis</i>	12
3.5.2	<i>Crosslinking por irradiação.</i>	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Matéria-Prima e Reagentes	16
4.2	Metodologia	17
4.2.1	<i>Extração de queratina das penas de frango de corte</i>	17
4.2.2	<i>Obtenção de nanopartículas de queratina através do método de dessolvatação</i>	17
4.2.3	<i>Caracterização da queratina e nanoqueratina obtidas de penas de frango de corte</i>	17
4.2.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	18
4.2.3.2	<i>Potencial Zeta (ζ) e Tamanho de partícula</i>	18
4.2.3.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	18
4.2.4	<i>Extração de bioapatita do resíduo ósseo do frango de corte</i>	18
4.2.5	<i>Caracterização da bioapatita obtida do resíduo ósseo de frango de corte</i>	19
4.2.5.1	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	20
4.2.5.2	<i>Difração de raios-X (DRX)</i>	20
4.2.5.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura/Espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)</i> ...	21
4.2.6	<i>Extração de colágeno das peles e tendões de pés de frango</i>	21
4.2.7	<i>Caracterização do colágeno obtido de peles e tendões de frango de corte</i>	22
4.2.7.1	<i>Espectroscopia de Absorção UV-VIS</i>	22
4.2.7.2	<i>Temperatura de desnaturação por análise de viscosidade do colágeno em solução</i>	22
4.2.8	<i>Preparo de hidrogéis de colágeno/nanoqueratina/bioapatita através de reticulação com riboflavina</i>	23
4.2.9	<i>Caracterização dos hidrogéis de colágeno/bioapatita e nanoqueratina</i>	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	<i>Caracterização das penas in natura, queratina e nanoqueratina obtidas</i>	25

5.1.1	<i>Composição da queratina</i>	25
5.1.2	<i>MEV</i>	26
5.1.3	<i>FTIR</i>	27
5.1.4	<i>Caracterização térmica da queratina</i>	27
5.2.	Caracterização da nanoqueratina obtida através do método de dessolvatação.	28
5.2.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	28
5.2.2	<i>Tamanho de partícula.</i>	29
5.2.3	<i>Potencial Zeta</i>	30
5.2.4	<i>FTIR</i>	30
5.2.5	<i>TGA</i>	31
5.3	Caracterização do resíduo ósseo de frango	32
5.4	Caracterização das Bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino	34
5.4.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão das bioapatitas (MET) das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino</i>	34
5.4.2	<i>FTIR das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino</i>	35
5.4.3	<i>TGA das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino</i>	37
5.4.4	<i>DRX das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino</i>	38
5.4.5	<i>EDS das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino</i>	39
5.5	Caracterização do colágeno	42
5.5.1	<i>Caracterização físico-química do material colagenoso</i>	42
5.5.2.	<i>MEV</i>	43
5.5.3	<i>FTIR</i>	44
5.5.4	<i>UV-Vis</i>	46
5.6	Caracterização dos hidrogéis de colágeno/bioapatita e nanoqueratina reticulados com UV/riboflavina	48
5.6.1	<i>MEV</i>	48
5.6.2	<i>FTIR</i>	49
5.6.3	<i>TGA</i>	51
5.6.4	<i>DSC</i>	51
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos a produção anual de carne de frango tem sido crescente, independente do cenário econômico mundial o setor avícola nacional continua a crescer, se consolidando como 2º maior produtor e exportador. Como motor deste processo, tem-se um cenário onde a qualidade e a sanidade envolvidas na produção nacional estão alinhadas a um grande dinamismo. Frente a um cenário tão promissor, o setor conta também com as pressões da sociedade no sentido de planejar e desenvolver suas atividades de forma sustentável e equilibrada, capaz de atender as exigências legais e mercadológicas mundialmente estabelecidas. Em função disto, se faz necessário o correto manejo dos resíduos gerados pelas atividades do setor avícola, bem como, o desenvolvimento de processos tecnológicos capazes de agregar valor a estes resíduos, de forma a fortalecer a cadeia produtiva e gerar novas possibilidades de emprego e renda (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2016)(PADILHA; SILVA; SAMPAIO, 2006).

O aproveitamento e agregação de valor a resíduos com potencial econômico está entre as principais práticas que fundamentam o uso racional dos recursos naturais. Como desafio a este ideal, vale ressaltar a produção de grande variedade de resíduos no processo de produção da carne de frango, muitos dos quais são fontes de proteínas e minerais potencialmente utilizáveis como insumos na produção de biomateriais. Dentre os quais destacam-se os resíduos sólidos: penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles e ossos diversos (EL BOUSHY, A. R.; VAN DER POEL, A. F., 1990). A partir de tais subprodutos é possível obter biomoléculas e minerais de enorme valor científico, tecnológico e comercial, uma vez que são detentores de propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas a diversas aplicações, incluindo a área biomédica (CHU; LIU, 2008).

A partir dos subprodutos supracitados, tem-se desenvolvido inúmeras pesquisas com o intuito de promover o uso racional dos mesmos, neste contexto a área de biomateriais tem sido responsável por grande parte das publicações. Tal fato pode estar associado ao crescimento do mercado de biomateriais promovido pelo crescimento na demanda gerado pelo aumento da expectativa de vida da população, aumento do poder aquisitivo nos países em desenvolvimento e melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis. Uma vez que, o conjunto destes fatores aumenta enormemente a demanda por materiais capazes de reparar ou substituir tecidos lesados, resultando em investimentos crescentes nas áreas capazes de contribuir com o seu desenvolvimento (PIRES, 2015).

Como mostram as pesquisas desenvolvidas nos últimos anos, o colágeno, a hidroxiapatita e a queratina, tem sido objeto de diversas pesquisas na área de biomateriais, dentre as quais vale ressaltar a síntese de hidrogéis a base de colágeno visando o uso como suporte para cultura de tecidos (MCCOY *et al.*, 2016; KUO *et al.*, 2015), enxertos ósseos produzidos a partir de hidroxiapatita e colágeno (SIONKOWSKA; KOZŁOWSKA, 2010) hidrogéis de queratina quimicamente modificada para liberação controlada de fármacos e cultura de tecidos (NAKATA *et al.*, 2015), uso de nanopartículas de queratina como reforço em scaffolds de quitosana para reconstrução de tecido ósseo (SARAVANAN *et al.*, 2013), entre outros.

Neste contexto, o presente trabalho busca extrair biomateriais a partir de subprodutos da indústria avícola e a partir destes obter um hidrogel com propriedades adequadas para utilização como suporte para cultura de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Utilizar nanoqueratina, bioapatita e colágeno extraídos a partir de subprodutos da indústria avícola como insumos para o desenvolvimento de hidrogéis com características adequadas para cultura de tecidos.

2.2 Objetivos específicos

Extrair colágeno, bioapatita e nanoqueratina a partir de subprodutos da indústria avícola;

Caracterizar os biomateriais obtidos através de análises morfológica, estrutural, cristalográfica e térmica;

Sintetizar hidrogéis de colágeno reforçado com nanopartículas de queratina e hidroxiapatita em diferentes concentrações através de reticulação com riboflavina/UV;

Avaliar a influência da adição dos agentes de reforço em diferentes concentrações nas características estruturais, térmicas e morfológicas dos hidrogéis obtidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria avícola

O Brasil desponta no cenário internacional como o 2º maior produtor de carne de frango, posto alcançado entre o final do ano de 2015 e o início de 2016. Segundo dados do Relatório Anual, (2016) da Associação Brasileira de Proteína Animal, neste ano o país atingiu a marca recorde de 13,146 milhões de toneladas de carne de frango, das quais 67,7 % se destinam ao mercado interno e os demais 32,3% a exportação. Números que colocam o país em posição de destaque internacional e que mostram quão desenvolvida é a capacidade produtiva do setor.

Entre os resíduos sólidos produzidos, podemos destacar os de natureza sólida como as penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles, ossos e esterco (OVIEDO-RONDÓN, 2008). Tais resíduos apresentam-se como importantes fontes de proteínas, lipídeos e minerais, tendo em função disto, grande potencial de aproveitamento enquanto insumos para produção de biomateriais com capacidade de promover substrato natural para proliferação e diferenciação celular. Uma vez que, grande parte dos subprodutos da indústria avícola contém biomoléculas e biopolímeros de interesse tecnológico, dentre os quais destacam-se a queratina, colágeno, ácido hialurônico, fibrinogênio e bioapatita, amplamente estudados.

3.2 Colágeno

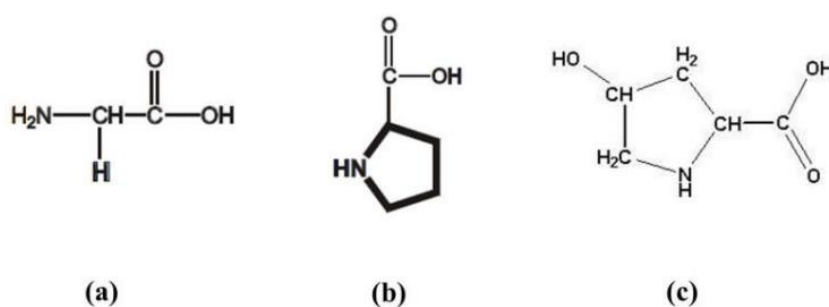
O colágeno é uma proteína estrutural, muito embora, exerça um papel muito mais amplo nos sistemas biológicos, estando diretamente relacionado com as funções exercidas por vários órgãos nos quais se faz presente. A palavra colágeno refere-se a capacidade de formar cola (gelatina) quando determinados tecidos são aquecidos em água. O colágeno é a proteína mais abundante em humanos e mamíferos de uma forma geral, apresentando em sua estrutura cadeias polipeptídicas dispostas paralelamente em forma de fibras (KUCCHARZ, 1993). Até o presente momento já são conhecidos 29 tipos de colágeno. Na Tabela 1 estão apresentados os principais tipos de colágeno e algumas de suas características.

Tabela 1 – Tipos e distribuição do colágeno.

Tipo	Classe	Distribuição nos tecidos
I	Formadores de fibrilas	Tipo mais abundante encontrado na pele, osso, ligamento, tendão, fibrocartilagem e córnea.
II	Formadores de fibrilas	Cartilagem hialina e elástica, disco intervertebral e humor vítreo.
III	Formadores de fibrilas	Prevalente nos vasos sanguíneos, pele e intestino.
IV	Formadores de redes	Lâminas basais e cápsulas do cristalino.
V	Formadores de fibrilas	Associado com o colágeno tipo I no osso, membrana da placenta e córnea.

Fonte: adaptação de Fratzl, 2008.

A estrutura do colágeno tipo I é composta por 3 cadeias polipeptídicas α , sendo duas idênticas ($\alpha 1$) e uma distinta ($\alpha 2$), cada cadeia possui uma sequência de aminoácidos caracterizada pela repetição dos componentes obedecendo a seguinte sequência (GLY-X-Y), sendo GLY=glicina, Y (prolina ou hidroxiprolina) e X um aminoácido qualquer (FRATZL, 2008). Na Figura 1 estão apresentadas as fórmulas dos principais aminoácidos presentes no colágeno.

Figura 1 - Fórmula estrutural dos principais aminoácidos presentes no colágeno.**(a) Glicina; (b) Prolina; (c) 4 – hidroxiprolina.**

Dentre todos, o tipo I é o mais amplamente utilizado como biomaterial, o que se deve principalmente à biocompatibilidade, promovida pela similaridade da sequência de aminoácidos entre as diversas espécies, biodegradabilidade e abundância, muito embora produza géis com resistência mecânica reduzida, o que em geral é contornado pela utilização de agentes reticulantes tais como o glutaraldeído. O colágeno é abundante na matriz

extracelular, em função disto é capaz de suportar a adesão e proliferação celular. O colágeno tipo I pode ser extraído dos tecidos onde encontra-se presente e reconstituído. Entre os métodos de extração podemos destacar a via ácida, que utiliza geralmente, o ácido acético a 4 °C por um período que varia entre 48 e 96 h. Extração por via enzimática, com o uso de ácido acético juntamente com uma protease, geralmente pepsina, a 4 °C por períodos que variam de 48 a 96 h (CHENG *et al.*, 2009)

3.3 Queratina

As queratinas são proteínas fibrosas de origem animal e juntamente com o colágeno constituem dois dos biopolímeros mais importantes no reino animal. Podem ser consideradas um dos materiais de origem biológica mais resistentes mesmo composta essencialmente de proteína, sendo em geral, de baixo teor mineral. Os materiais queratinosos são formados por células especializadas denominadas queratinócitos, presentes no tecido epitelial, estes materiais constituem compósitos biopoliméricos naturais, os quais apresentam uma estrutura hierarquicamente organizada desde a escala nanométrica, podendo ser encontrados em diversas espécies animais na forma de lã, penas, unhas, chifres e bicos, portanto, podendo desempenhar as mais variadas funções. Assim sendo, uma compreensão mais ampla das estruturas e suas funções nos tecidos queratinizados podem conduzir a elaboração mais objetiva de novos materiais (WANG *et al.*, 2016).

As queratinas costumam ser classificadas em função do tipo de estrutura secundária que suas cadeias assumem, α -hélice ou folhas- β -pregueadas, como α -queratina (α -hélice) ou β -queratina (folhas- β -pregueadas). Ambas constituídas por cerca de 21 aminoácidos e tendo o aminoácido sulfurado cisteína como componente majoritário (LODISH *et al.*, 2000). Outras classificações menos usuais também podem ser encontradas na literatura, sendo estas em função da forma como ocorre a biossíntese (GIROUD; LEBLOND, 1951), da quantidade de ligações cruzadas (CROUNSE, 1963), da sua origem animal (de aves, répteis ou mamíferos) ou de seu teor de enxofre (hard e soft) (FRASER *et al.*, 1972).

Tabela 2 – Distribuição de α - e β -queratinas.

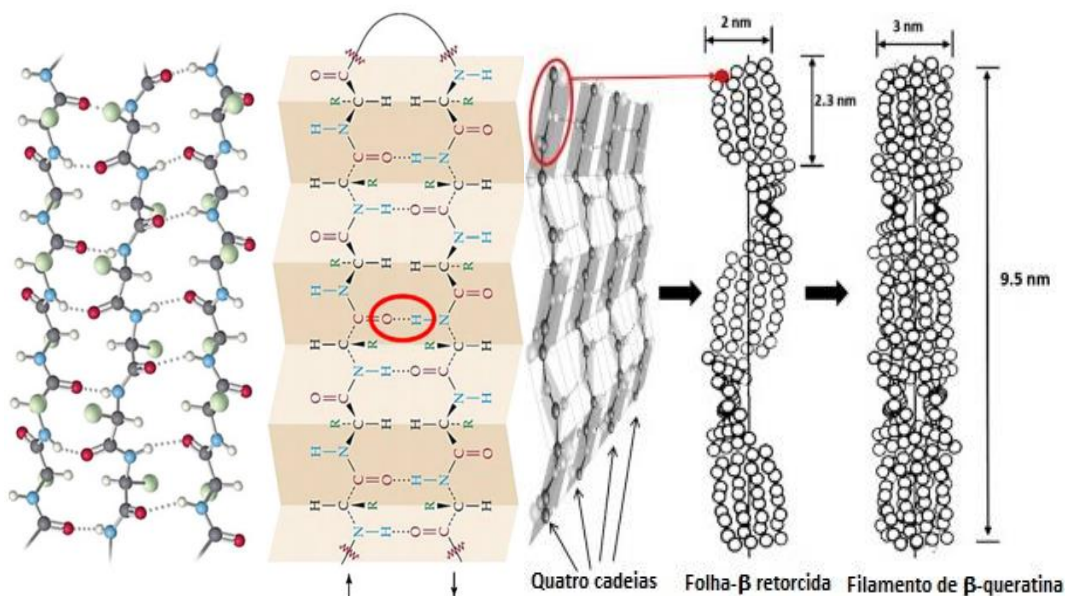
α-queratinas	Lã, pêlos, penas, unhas, chifres, cascos e estrato córneo
β-queratinas	Penas, bicos e garras de aves, garras de répteis e escamas
α e β-queratinas	Epiderme de répteis, escamas de Pangolin

Fonte: Adaptação de WANG *et al.*, 2016

Os materiais queratinosos são compostos por estruturas secundárias do tipo α ou β , apresentam-se a nível nanométrico na forma de uma matriz filamentosa, apenas diferindo quanto as características dos filamentos. No caso dos filamentos de β -queratina, temos filamentos de 3-4 nm de diâmetro, formados por apenas um tipo de proteína com massa molecular de 10-22 KDa. (SQUIRE *et al.*, 1987). No caso da α -queratina, a matriz filamentosa é composta por filamentos intermediários com diâmetro que varia entre 7-10 nm, compostos por mais de um tipo de proteína com massa molecular que varia de 40 a 68 KDa (ALIBARDI *et al.*, 2006). Tais filamentos são formados por cadeias polipeptídicas unidas firmemente umas às outras em um arranjo cristalino (BEAR; RUGO, 1951).

A estrutura molecular e seus mecanismos de formação são as características mais importantes na diferenciação entre α e β -queratinas. A estrutura dos filamentos de β -queratina é formada por cadeias polipeptídicas dispostas paralelamente ou anti-paralelamente, ligadas lateralmente por ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos N-H de uma cadeia e os grupos C=O de outra contribuindo para dar estabilidade a estrutura (LODISH *et al.*, 2000). A Figura 2 – apresenta a estrutura dos filamentos de beta-queratina.

Figura 2 – Estrutura dos filamentos de β -queratina.



Fonte: Adaptação de FRASER *et al.*, 1972

As cadeias da proteína são compostas por sequências de aminoácidos que definem onde ocorrem interações intermoleculares e o acesso a ligações químicas. Um dos aminoácidos mais abundantes na queratina é o aminoácido sulfurado cisteína, que torna possível o grande número de ligações dissulfeto intra e intermoleculares que conferem a queratina propriedades como resistência mecânica e pouca solubilidade em um grande número de solventes. A cisteína presente nas queratinas encontra-se na forma de cistina, um aminoácido formado pela ligação entre duas moléculas de cisteína através de uma ligação dissulfeto. Este aminoácido localiza-se em grande parte nas regiões terminais da proteína. Como boa parte dos biomateriais de origem natural, a queratina possui biocompatibilidade e atividade biológica sendo capaz de formar uma matriz tridimensional adequada a infiltração, adesão e proliferação celular.

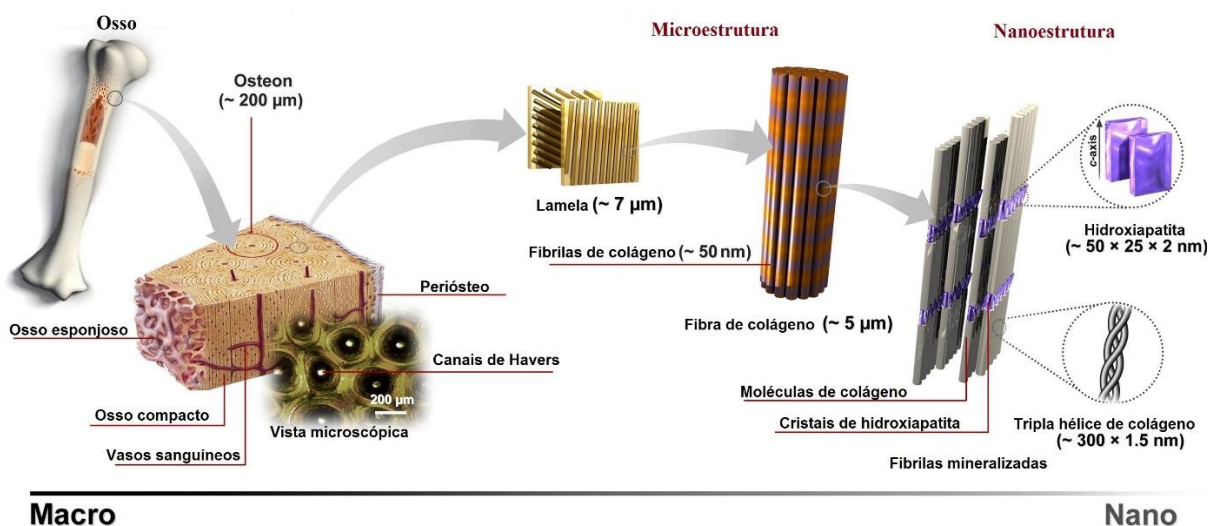
3.4 Bioapatita

O termo “apatita” pode ser aplicado a todos os compostos com fórmula geral $A_{10}(BO_4)_6Z_2$ (ou $M_5(XO_4)_3X$), onde A é geralmente um cátion metálico divalente (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+}), BO_4^{3-} um ânion trivalente com B geralmente sendo um metal (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} ou MnO_4^{3-}) e X um ânion monovalente (F^- , Cl^- , OH^- ou Br^-). O nome específico de cada apatita depende dos elementos ou radicais A, B e X. Nestes termos, a hidroxiapatita estequiométrica é caracterizada por apresentar a estrutura cristalina de apatita, onde A é cálcio (Ca^{2+}), BO_4 tem B

como fósforo (PO_4^{3-}) e X é o radical hidroxila (OH^-). A hidroxiapatita estequiométrica apresenta relação Ca/P molar de 1,67, relação mássica Ca/P de 2,15 e sua fórmula química, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possui 39,9% em peso de Ca, 18,5 % de P e 3,38 % de OH (APARÍCIO e GINEBRA, 2015). No entanto, a hidroxiapatita biológica possui diferenças marcantes em relação à estequiométrica, desde sua composição até sua cristalinidade, e consequentemente nas propriedades físicas e mecânicas. As apatitas biológicas, em geral, são cálcio deficientes tendo por isto razão molar Ca/P inferior a 1,67, sendo, portanto, não estequiométricas, geralmente menos cristalinas, carbonatadas e em função disto de maior solubilidade. Já que a maior quantidade de carbonato diminui o tamanho do cristal, aumentado a área superficial e assim a solubilidade. Este conjunto de características é responsável por atribuir às apatitas biológicas um maior grau de semelhança com a fase mineral do osso humano (IBUKI, 2014).

A porção inorgânica do osso é constituída de cristais de hidroxiapatita alinhados paralelamente ao longo do eixo das microfibrilas, sendo resultante do processo de biomineralização das fibrilas de colágeno em dois ambientes de diferentes tamanhos. Um ambiente de maior tamanho, entre as terminações das microfibrilas e um de menor tamanho, alinhado lateralmente com as microfibrilas (PASTERIS; WOPENKA, 2008). A figura 3 apresenta a estrutura hierárquica da matriz óssea.

Figura 3 – Estrutura hierárquica da matriz óssea.



Fonte: Adaptação de Sadat-Shojai *et al.*, (2013).

A hidroxiapatita tem sido amplamente estudada nas últimas décadas em função de suas propriedades físico-químicas adequadas a reparação do tecido ósseo. Sua

biocompatibilidade, resulta principalmente de sua similaridade química com a fase inorgânica dos tecidos calcificados, o que lhe confere propriedades como osteocondução e bioatividade, não produzindo reações imunológicas ou inflamatórias. Entre as formas de obtenção da hidroxiapatita destacam-se o isolamento, sendo mais comumente extraída de ossos animais; síntese a partir de reação com um precursor de Ca e íons fosfato; síntese *in situ* com o auxílio de moléculas de origem biológica e síntese utilizando biomembranas. O isolamento de bioapatita a partir de osso xenógeno apresenta algumas vantagens em relação aos demais, sendo a similaridade morfológica, estrutural e química com o osso humano uma das mais citadas, também deve-se considerar o fato de que ossos xenógenos são uma matéria prima barata e largamente disponível (ŠUPOVÁ, 2014).

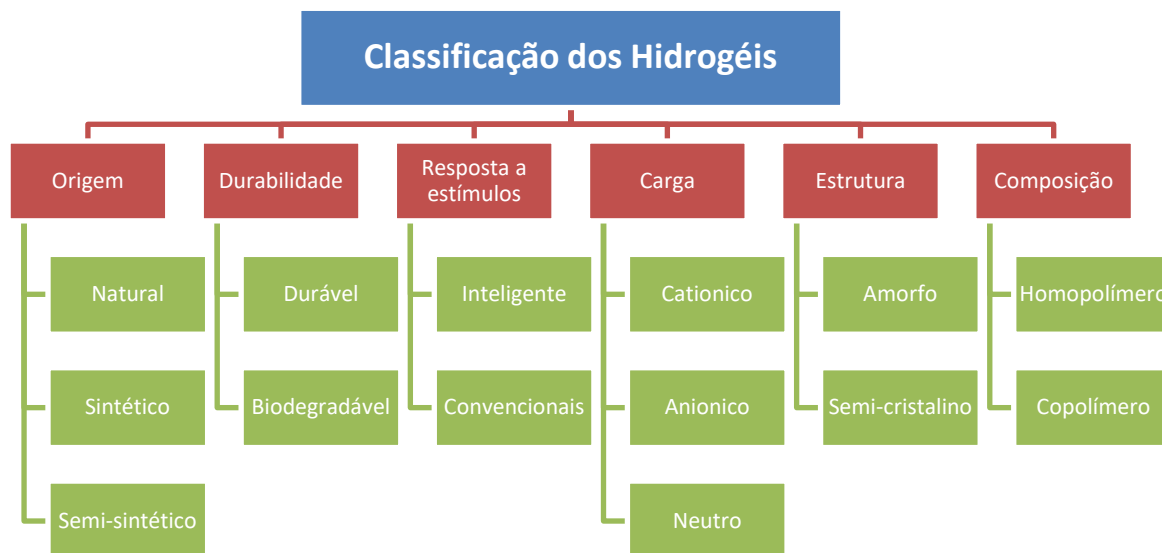
3.5 Hidrogéis

Hidrogéis são compostos por cadeias poliméricas tridimensionais capazes de reter grandes quantidades de água e fluidos biológicos. Esta capacidade se deve a sua hidrofilicidade, conferida pela presença de grupamentos ao longo das cadeias poliméricas tais como amino, amida, carboxila e hidroxila, além de propriedades tais como porosidade e consistência suave. O conjunto de todos estes fatores faz com que sua estrutura alcance um alto grau de semelhança com a matriz extracelular, tornando-os capazes de simular tecidos biológicos e exibindo excelente biocompatibilidade no que se refere a suportar o crescimento e proliferação celular (HOFFMAN, 2012).

Os hidrogéis podem ser classificados quanto a natureza das forças que mantêm coesa a estrutura polimérica, ou seja, dependendo da natureza das ligações cruzadas (reticulação) que as cadeias poliméricas são capazes de realizar os hidrogéis podem ser classificados em duas classes, químicos ou físicos. Os géis do tipo físico possuem estruturas resultantes de interações do tipo inter ou intramoleculares, ligações de hidrogênio ou ligações iônicas e por isso também são denominados reversíveis. Já os géis do tipo químico, são resultantes de ligações covalentes e por isto são chamados de permanentes, ao contrário dos físicos que são ditos reversíveis, uma vez que este tipo possui interações que podem ser enfraquecidas quando se alteram condições do meio, tais como temperatura e pH, levando a transição do estado de gel para solução. Dependendo da composição pretendida, os hidrogéis também podem ser formados a partir de mais de um tipo de interação entre seus constituintes

(AHMED, 2015). A Figura 4 apresenta de forma esquemática as principais classificações atribuídas aos hidrogéis.

Figura 4 - Diagrama esquemático das classes de hidrogéis



Fonte: El-Sherbiny e Yacoub (2013).

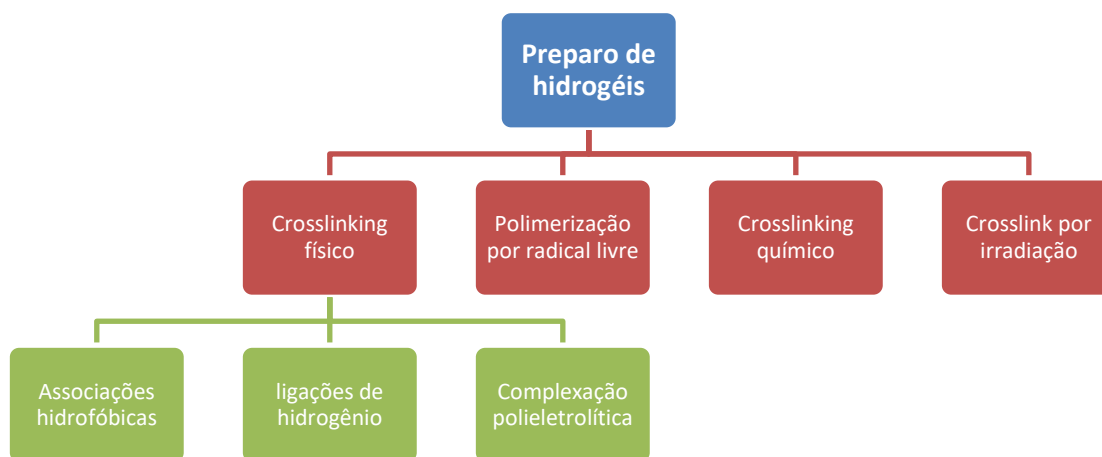
Os hidrogéis têm sido amplamente estudados no desenvolvimento de aplicações biomédicas desde engenharia de tecidos a liberação controlada de fármacos. As redes poliméricas dos hidrogéis são constituídas de cadeias polares reforçadas por ligações cruzadas, o que torna possível a contenção de grandes quantidades de fluídos sem que haja dissolução. Os polímeros capazes de formar hidrogéis podem ser de origem natural ou sintética, dentre os polímeros naturais destacam-se o colágeno, quitosana, alginato, gelatina, ácido hialurônico e albumina. Já entre os de origem sintética estão o poli(óxido de etileno), poli(ácido acrílico), polihidroxibutirato, álcool polivinílico, entre outros. No caso da engenharia de tecidos, o hidrogel deve ser capaz de servir como uma matriz extracelular sintética que organize as células em uma arquitetura tridimensional orientando a formação e o crescimento do tecido desejado (DRURY; MOONEY, 2013). Os já citados polímeros naturais possuem potencial para tal, em função de serem componentes ou possuírem propriedades similares a da matriz extracelular, o que lhes garante biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e não indução de resposta imunológica. O colágeno, por exemplo, por ser uma das proteínas mais abundantes nos tecidos de mamíferos é largamente disponível, também constituindo majoritariamente a matriz extracelular natural. As moléculas de colágeno são capazes de se auto organizar para formar fibrilas quando submetidas às condições fisiológicas, porém estas fibrilas são formadas

através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas, as quais não promovem a estabilidade necessária para a manutenção das fibrilas e permitindo que elas facilmente possam ser desfeitas em função de mudança de pH, força iônica ou aumento da temperatura. O resultado dessas interações fracas é a capacidade que o colágeno possui de formar géis, no entanto, são obtidos géis com baixa resistência mecânica, baixa estabilidade térmica e rápida degradação, ou seja, géis com propriedades que não atendem às exigências necessárias às aplicações *in vivo* (TIAN *et al.*, 2016). Para contornar este problema diversas estratégias tem sido desenvolvidas, entre elas, podemos citar a formação de ligações cruzadas por via química, térmica, com uso de luz UV e pela mistura com outros agentes poliméricos (PEPPAS *et al.*, 2006).

3.5.1 Métodos de preparo de hidrogéis

Dentre os métodos de preparo de hidrogéis, o mais comumente utilizado é o crosslink químico. Este pode ser aplicado tanto em polímeros naturais quanto sintéticos, desde que hajam cadeias poliméricas hidrofílicas que possuam grupos funcionais adequados para reagir com um agente reticulante escolhido. Um exemplo bastante comum deste método é a utilização de glutaraldeído, um aldeído bifuncional, na reticulação de hidrogéis compostos por proteína. Os seus grupamentos aldeído reagem com os grupamentos amino da lisina e hidroxilisina do colágeno, resultando na formação de bases de Schiff que ligam uma hélice a outra (TIAN *et al.*, 2016) (OLDE DAMINK *et al.*, 1995). Na figura 5 é possível observar um diagrama esquemático onde se encontram os métodos mais comuns de preparo de hidrogéis.

Figura 5 - Diagrama esquemático dos métodos mais comuns de preparo de hidrogéis



Fonte: El-Sherbiny e Yacoub (2013).

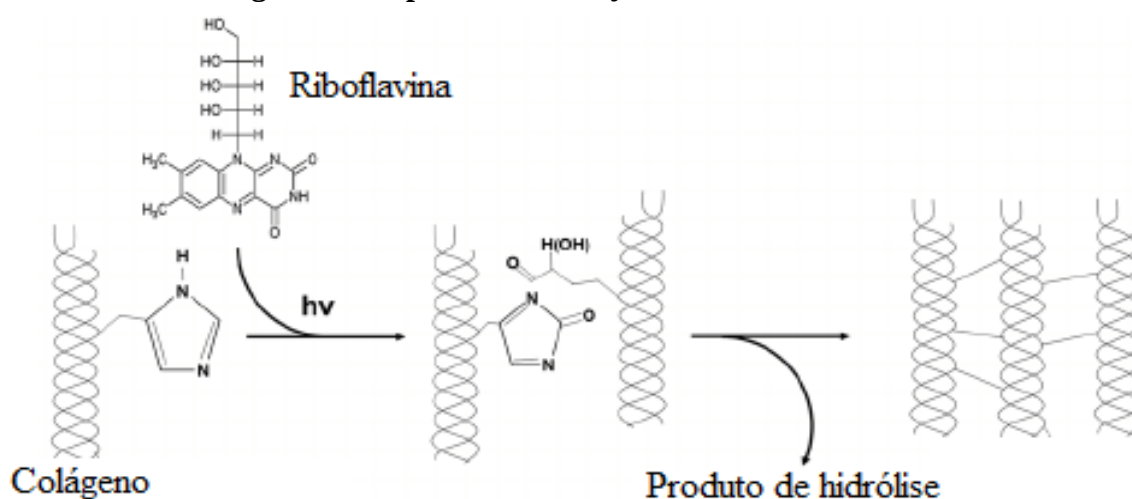
Outras vias de obtenção de hidrogéis propostas na literatura utilizando interações físicas são por associações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e complexação polieletrólítica. Onde em geral, são utilizadas condições brandas em relação a via química. Na complexação polieletrólítica, ou coacervação, as conexões entre uma cadeia e outra são realizadas entre pares de grupos carregados com cargas opostas distribuídos ao longo das cadeias poliméricas. Como exemplo, podemos citar a complexação polieletrólítica entre os grupos carboxilatos (aniônicos) do alginato de sódio com os grupos amino (catiônicos) presentes ao longo das cadeias de quitosana. Este tipo de ligação cruzada é sensível à variações no pH do meio, uma vez que, a carga dos grupamentos que participam destas interações pode ser alterada em função da concentração de íons H_3O^+ e OH^- , desta forma, resultando em interações reversíveis (ANAL; STEVENS, 2005). As ligações de hidrogênio também são capazes de servir como crosslinking e promover as características necessárias para formação de um hidrogel. Os geis obtidos através deste tipo de interação são sensíveis a concentração do polímero, razão molar de cada um dos componentes do compósito, tipo de solvente, pH e temperatura da solução. Como exemplo de hidrogéis deste tipo, pode-se citar aqueles preparados a base de gelatina (EL-SHERBINY; YACOUN 2013). Ácido polimetacrílico (PMMA) e polietilenoglicol (PEG) também são exemplos de géis formados através de ligações de hidrogênio entre o oxigênio do PEG e o grupamento carboxila do PMMA, apresentando capacidade de retenção de água altamente dependente do pH do meio, uma vez que as ligações de hidrogênio necessárias a formação do hidrogel somente são possíveis quando o grupamento carboxila do PMMA se encontra protonado.

3.5.2 Crosslinking por irradiação.

Outro método de preparo de hidrogéis que tem se mostrado bastante promissor é o crosslinking por irradiação com a utilização de uma substância sensível a radiação que irá dar início à reticulação, denominada fotoiniciador. Dependendo do fotoiniciador utilizado, este método pode ser mais limpo, por não gerar subprodutos e prático, devido a rapidez com a qual a reação ocorre e a quantidade de fatores a serem controlados para a obtenção do resultado desejado. Em geral, necessita-se controlar apenas a concentração do fotoiniciador e a quantidade de radiação que irá incidir. No caso da utilização de radiação UV no preparo de hidrogéis para fins biomédicos, tem-se uma vantagem a mais, o fato de que a radiação UV também promove a esterelização da solução enquanto se realiza o crosslinking.

A riboflavina (Figura 6), é uma vitamina hidrosolúvel do complexo B₂. Devido a sua fotossensibilidade, ao ser irradiada, possui a capacidade de liberar radicais livres que possibilitam a realização de ligações cruzadas. Esta propriedade, tem lhe conferido ampla utilização em aplicações oftalmológicas que visam o aumentando da estabilidade biomecânica da córnea humana através a reticulação do colágeno corneano.(MCCALL *et al.*, 2010). Diferentemente de outros compostos, como o glutaraldeído, amplamente utilizados como reticulantes, a riboflavina não apresenta citotoxicidade, sendo por isso biocompatível e adequada ao preparo de biomateriais.

Figura 6- Etapas da reticulação com riboflavina/UV.



Fonte: Heo *et al.*, 2016

Na última década vários estudos tem sido desenvolvidos com o intuito de desenvolver hidrogéis a base de colágeno reticulado com riboflavina com potencial para serem utilizados em engenharia de tecidos, dentre eles destacam-se a investigação da capacidade dos géis para serem utilizados na regeneração do menisco (HEO *et al.*, 2015), o aperfeiçoamento das condições de reticulação no intuito de melhorar as propriedades mecânicas dos géis (TIRELLA *et al.*, 2012). A investigação da viabilidade celular de células encapsuladas antes da incidência da radiação UV (AHEARNE *et al.*, 2007). O melhoramento das condições de preparo, incluindo o uso de reticulação física juntamente com a reticulação por irradiação visando a melhoria das propriedades mecânicas e o efeito da concentração de riboflavina na microestrutura do hidrogel. (AHEARNE *et al.*, 2016). No entanto, a influência de outros biopolímeros nas propriedades de hidrogéis obtidos através da utilização de riboflavina/UV ainda precisa ser investigada, uma vez que os trabalhos utilizando este método de preparo limitam-se a utilização do colágeno isoladamente. Assim sendo, este trabalho busca investigar a capacidade da riboflavina quando

da adição de nanoqueratina e hidroxiapatita de origem biológica na reticulação através de irradiação ultravioleta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matéria-Prima e Reagentes

Os subprodutos (penas e pés de frango) foram fornecidos por uma indústria avícola da cidade de Fortaleza-Ce.

Ácido Acético Glacial (CH_3COOH) P.A. Vetec

Ácido Clorídrico (HCl) P.A. Sigma-Aldrich

Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.A. - Synth

Glutaraldeído a 25% (v/v) ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) P.A. - Vetec

Hidróxido de sódio Lentilhas (NaOH) P.A. - Vetec

Pepsina da mucosa gástrica de suíno Sigma-Aldrich.

riboflavina 5'- monofosfato de sódio - Sigma-Aldrich.

Tampão fosfato-salino 10X (PBS - 10X) a pH = 7,4 - Sigma-Aldrich.

4.2. Metodologia

4.2.1 Extração de queratina das penas de frango de corte

As penas foram previamente lavadas com água e detergente neutro, secadas por 48 h a 40 °C em estufa com circulação de ar, lavadas uma última vez com álcool 70% (v/v) para a remoção de óleos e gorduras, e secas por mais 24 h a temperatura ambiente. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas (Tecnal-TE 058) e armazenadas a temperatura ambiente. Inicialmente, 100 g de penas limpas, secas e trituradas foram submetidas a extração em solução de NaOH 5% (m/m) na proporção de 1:40 (m/v) respectivamente, a 40 °C durante 4 h sob agitação mecânica constante. A solução obtida foi filtrada e submetida a diálise em membranas contra água destilada por 48 h, com troca de água após 24 h. Decorrido este tempo, a queratina foi precipitada pela adição de HCl 2 mol L⁻¹ até a obtenção de pH 4,2, em seguida, foi centrifugada a 10.000 rpm, a 25 °C por 10 min e lavada várias vezes até obtenção de pH neutro. A metodologia descrita foi adaptada a partir do procedimento proposto por Saravanan *et al.* (2013).

4.2.2 Obtenção de nanopartículas de queratina através do método de dessolvatação

Inicialmente, 1 g de queratina liofilizada foi solubilizado em 20 mL de água deionizada a pH 8. Em seguida, 80 mL de etanol absoluto foram adicionados sob agitação constante a uma taxa de 1 mL/min. 1 µL de glutaraldeído 8% (v/v) foi adicionado como agente reticulante das moléculas de proteína. A solução resultante foi agitada durante 24 h. Decorrido este período as nanopartículas foram centrifugadas durante 15 min a 13 000 rpm, por vários ciclos de lavagem, para remover o glutaraldeído residual, sendo submetidas a ultrassonicação em banho de ultrassom por 5 min entre cada lavagem. Por fim, as nanopartículas foram liofilizadas e caracterizadas. A metodologia descrita foi adaptada a partir do procedimento proposto por Saravanan *et al.* (2013).

4.2.3 Caracterização da queratina e nanoqueratina obtidas de penas de frango de corte

Após a liofilização as amostras foram trituradas em moinho analítico de impacto, e caracterizadas por MEV, TGA e FTIR. As penas e a queratina foram caracterizadas quanto a sua composição através da determinação dos teores de lipídios e de proteínas, de acordo com o procedimento descrito pelas normas do Instituto Adolf Lutz, umidade utilizando uma balança

de infravermelho e análise de cinzas, de acordo com a norma TAPPI T 413. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A análise de FTIR foi realizada segundo o procedimento descrito no subitem 4.2.5.1.

A nanoqueratina obtida também foi caracterizada quanto a sua estabilidade em suspensão através da medida do potencial Zeta da solução e tamanho de partícula.

4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar a microestrutura e morfologia das superfícies das penas, queratina e nanoqueratina. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca HITACHI, modelo TM3000, magnificação 15- 30000x (zoom digital: 2, 4x) tensão aceleração 5kv (modo de observação de superfície) e 15kv (modo normal, modo de análise e alto contraste).

4.2.3.2 Potencial Zeta (ζ) e Tamanho de partícula

As análises de potencial Zeta e tamanho de partícula foram realizadas em triplicata no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. A suspensão de nanoqueratina foi preparada em diluição de 1:40 em água deionizada a pH 8,2. Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula com potencial Zeta modelo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), operando na temperatura de 25°C.

4.2.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia da Biomassa em um equipamento STA 6000/8000, PerkinElmer, em atmosfera de ar sintético sob um fluxo de 40 mL/min, com taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 20 a 800°C, utilizando massas de aproximadamente 10 mg.

4.2.4 Extração de bioapatita do resíduo ósseo do frango de corte

Os ossos de frango foram obtidos em um abatedouro local e em seguida separados manualmente dos resíduos de carne. Secos em estufa com circulação de ar durante 24 h, em seguida congelados até o momento das análises. 200 g de ossos descongelados foram imersos

em solução de NaCl 2% (m/v) na proporção de 1:10 de massa de ossos para solução e autoclavados durante 30 min a 120 °C, ao final do processo, os ossos foram separados da solução por decantação e secos em estufa com circulação de ar por 16 h. Em seguida, os ossos foram triturados em moinho analítico e imersos em uma mistura de acetona:éter (3:2) na proporção de 1:2 de massa de ossos para volume de solução. A mistura foi deixada em repouso durante 24 h, em seguida filtrada e os ossos levados a secagem em estufa com circulação de ar durante 3h. Seguida a etapa de desengorduramento, os ossos passaram por uma etapa de remoção de proteínas, onde foram implementadas 2 condições diferentes com o intuito de avaliar a eficiência do processo e possíveis mudanças na composição química e estrutural do produto em função do tempo e da proporção de ossos para solução. Os ossos desengordurados foram desagregados em moinho analítico de impacto e desproteinizados em solução de NaOH 4% (m/v) nas proporções de 1:20 e 1:40 (m/v), ambas proporções durante 24h. Ao final do processo, o material inorgânico foi filtrado em papéis de filtro de 28 µm e lavado até pH neutro, seco novamente, e calcinado em mufla a 500 °C durante 18h. Ao final da calcinação as amostras foram resfriadas e em seguida lavadas com água deionizada até pH neutro com uso de papel de filtro de 28 µm, por fim, secas em estufa a 80°C. A tabela 3 apresenta as 2 condições utilizadas no processo de desproteínização. A metodologia descrita foi adaptada a partir do procedimento hidrotérmico alcalino utilizado por Šupová *et al.*, (2011).

Tabela 3 - Condições utilizadas no processo de desproteínização.

Amostra	Bioapatita 1	Bioapatita 2
Tempo (h)	24	24
Proporção ossos/solução (m/v)	1:20	1:40

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.5 Caracterização da bioapatita obtida do resíduo ósseo de frango de corte

As bioapatitas obtidas foram caracterizadas por FTIR, DRX, Microscopia eletrônica de varredura acoplada a Espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS) e TGA. Tais análises tiveram como intuito a determinação do tamanho e formato das partículas de bioapatita, o teor de carbonato presente, pureza, grau de cristalinidade e razão molar Ca/P, respectivamente.

4.2.5.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrofotômetro FTLA 2000-102, ABB-BOMEM com 25 varreduras na faixa de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . As análises de FTIR foram realizadas no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. O teor de carbonato presente nas amostras de bioapatita foi determinado segundo a equação dada por Murugan *et al.*, (2006), que compara a transmitância de uma banda de carbonato localizada em aproximadamente 1450 cm^{-1} com uma banda de fosfato localizada em aproximadamente 569 cm^{-1} , como descrito na equação 2:

$$CO_3^{2-}\% = 13,5 * \log\left(\frac{T_2}{T_1}\right) - 0,2$$

Onde:

CO_3^{2-} – teor de carbonato

T_2 – Transmitância no pico máximo da banda de carbonato localizada em aproximadamente 1450 cm^{-1}

T_1 – Transmitância no pico máximo da banda de fosfato localizada em aproximadamente 569 cm^{-1}

4.2.5.2 Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-X é uma importante técnica para a identificação e caracterização estrutural de materiais cristalinos presentes numa amostra. Esta técnica consiste em incidir um feixe de raios-X de comprimento de onda igual a $1,5418\text{ Angstroms}$ na amostra para o registro das fases cristalinas presentes. As medidas de difração de raios X das amostras de bioapatita calcinadas a 500°C foram realizadas em um difratômetro Xpert modelo MPD, com tubo de Cobalto (Co) para as bioapatitas 1 e 2 e tubo de Cobre (Cu) para as bioapatitas 3 e 4 em 40kV e 30mA , de 20° a 60° em ângulo 2θ . As análises de DRX foram realizadas no Laboratório de raios X da Universidade Federal do Ceará. O índice de cristalinidade (IC) foi calculado pela equação 1, dada por :

$$IC\% = 1 - \left(\frac{V_{112}}{I_{300}}\right) * 100$$

Onde:

IC – Índice de cristalinidade (%)

$v_{112}/_{300}$ – A intensidade do vale entre os picos correspondentes aos planos (112) e (300)

I_{300} – A intensidade do pico correspondente ao plano (300)

4.2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura/Espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite observar a microestrutura e morfologia das superfícies das amostras. As bioapatitas 1-4 foram metalizadas com ouro utilizando metalizador Emitech K550. Em seguida, foram analisadas por MEV em um microscópio ZEISS-DSM 940-A, operando a 15kV. A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada em um microscópio eletrônico de bancada da marca HITACHI TM 300 com periférico acoplado do tipo EDS SWIFT ED 3000.

4.2.6 Extração de colágeno das peles e tendões de pés de frango

Peles e tendões foram separadas manualmente dos ossos dos pés de frango. Em seguida, sanitizados com solução de hipoclorito e armazenados a -18 °C até o momento da extração. Após descongelamento, 800 g do material foram imersos em solução de NaOH 0,05 mol/L a 8 °C na proporção de 1:10 (m/v) e mantidos sob agitação durante 24 h. Ao final deste período, o material foi lavado com água destilada refrigerada a 8 °C, até a obtenção de pH neutro, em seguida, imerso em solução de etanol 10 % (v/v) a 8 °C na proporção de 1:10 (m/v) de massa para volume de solução, sob agitação durante 24h. Em seguida, procedeu-se a desmineralização, na qual peles e tendões foram imersos em solução de EDTA 0,05 mol/L a pH 8 na proporção de 1:10 (m/v) respectivamente, resfriada a 8 °C, sob agitação durante 24 h. Após o término da desmineralização, as cartilagens foram lavadas com água destilada a 8 °C, em seguida, imersas em solução de ácido acético 0,5 mol/L e 100 ppm de pepsina a 8 °C na proporção de 1:25 (m/v), e mantidas sob agitação constante durante 72h. A solução obtida foi filtrada com o intuito de remover a porção não solubilizada e em seguida precipitada pela adição de NaCl até a concentração de 0,9 mol/L. A solução foi mantida em repouso durante 24h para melhor eficiência. Após precipitação, o colágeno foi centrifugado a 4 °C durante 5 min a 13000 rpm. Centrifugado, o colágeno foi redissolvido em ácido acético 0,5 mol/L e novamente

precipitado pela adição de NaCl. Esta etapa de purificação foi repetida mais 2 vezes. Em seguida, o colágeno foi dialisado contra solução de NaHPO_4^{2-} 0,02 mol/L a 8 °C por 48 h, utilizando-se membrana de 12-14 KDa. Decorrido este período, procedeu-se a diálise contra água destilada até a obtenção de pH neutro. Por fim, o colágeno foi liofilizado e estocado até o momento das análises. A metodologia descrita foi adaptada a partir do procedimento proposto por Zeng *et al.*, (2009).

4.2.7. Caracterização do colágeno obtido de peles e tendões de frango de corte

Após purificação descrita acima, o colágeno liofilizado foi caracterizado por FTIR, MEV, UV-Vis, temperatura de desnaturação por viscosimetria segundo seus teores de proteína, lipídeos e cinzas, seguindo os protocolos padrão propostos pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). A análise de FTIR foi realizada segundo o procedimento descrito no subitem 4.2.5.1. A análise de MEV foi realizada segundo o procedimento descrito no subitem 4.2.3.1.

4.2.7.1 Espectroscopia de Absorção UV-VIS

O colágeno foi dissolvido em solução de ácido acético 0,5 mol.L⁻¹ até uma concentração final de 1 mg/mL. Foi feito uma linha de base com solução de ácido acético 0,5 mol/L. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro UV–VIS 2450 (SHIMADZU), no intervalo de comprimento de onda de 190 – 550 nm.

4.2.7.2 Temperatura de desnaturação por análise de viscosidade do colágeno em solução

Para a realização desta análise foi utilizado um viscosímetro Brookfield Synchroelectic Viscometer modelo DV II+, acoplado a banho ultratermostático Solab SL 152. O experimento mede a viscosidade da amostra através da determinação do torque necessário para rotacionar um spindle imerso na amostra. As medidas de viscosidade foram feitas em varredura de 10,7°C a 50,7°C, com a utilização de um spindle S01, a uma velocidade 100 rpm, com taxa de aquecimento de 2°C/min. O colágeno foi solubilizado em ácido acético 0,5 mol. L⁻¹ até uma concentração final de 0,37% (m/v).

4.2.8. Preparo de hidrogéis de colágeno/nanoqueratina/bioapatita através de reticulação com riboflavina

Foram sintetizados hidrogéis em 4 composições distintas com teor de 1,5% de sólidos dissolvidos. Inicialmente o colágeno foi dissolvido em ácido acético 0,05 mol.L⁻¹ durante 24 h, sob agitação mecânica a temperatura de 4 °C. Após a dissolução, a solução de colágeno foi neutralizada utilizando-se NaOH a 5% (m/m). Em seguida, adicionou-se 1 parte de tampão PBS 10X para 9 partes do volume de solução. Após tamponação, foram adicionados a hidroxiapatita e a nanoqueratina nas percentagens descritas abaixo e por último a riboflavina para uma concentração final de 0,005%, mantendo-se a mistura em agitação para a correta homogeneização dos constituintes. Por fim, a mistura foi disposta em placas de petri, com uma altura de aproximadamente 4 mm de solução e exposta a radiação com potência de 15 mW/cm² durante 30 min em uma câmara de UV da marca Bioforce, modelo UV/Ozone ProCleaner Plus para reticulação química entre os aminoácidos das fibrilas de colágeno. Ao final do período de exposição à luz UV as soluções precursoras dos hidrogéis apresentaram-se mais rígidas e com forma definida, ou seja, o crosslinking foi realizado possibilitando a transição de solução para gel. A metodologia descrita foi adaptada a partir do procedimento proposto por Heo *et al.* (2015).

Tabela 4 – Composição percentual dos hidrogéis.

Hidrogel	Colágeno (%)	Nanoqueratina (%)	Hidroxiapatita (%)
C ₁₀₀	100	-	-
C ₉₀ NQ _{7,5} HA _{2,5}	90	7,5	2,5
C ₉₀ NQ ₅ HA ₅	90	5	5
C ₉₀ NQ _{2,5} HA _{7,5}	90	2,5	7,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.9 Caracterização dos hidrogéis de colágeno/bioapatita e nanoqueratina

Os hidrogéis obtidos foram liofilizados e submetidos as seguintes caracterizações: FTIR, TGA, DSC e MEV. As quais, foram realizadas com o intuito de avaliar a adequação das propriedades físicas e químicas dos hidrogéis à sua utilização como scaffold para cultura de tecidos. A análise de FTIR foi realizada segundo o procedimento descrito no subitem 4.2.5.1. . A análise de MEV foi realizada segundo o procedimento descrito no subitem 4.2.3.1. A análise de TGA foi realizada segundo o procedimento descrito no subitem 4.2.3.3.

4.2.9.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

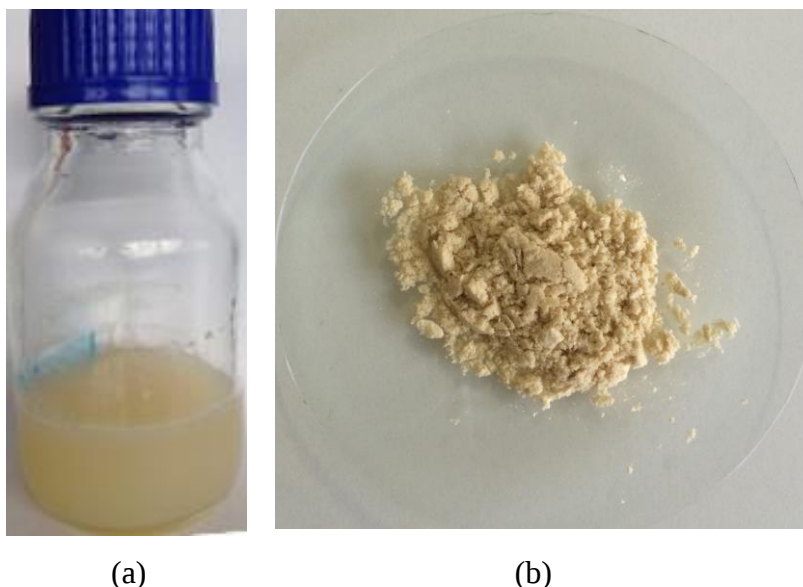
A análise de DSC foi realizada em um equipamento DSC Q20 V24.9 Build 121 e gás nitrogênio com vazão de 50 mL/min. O experimento foi realizado a uma taxa de 1°C/min com uma temperatura de equilíbrio de 25°C e uma temperatura final de 90°C, com massa de amostra inicial de 5,0 mg e utilizando panela de alumínio selada. Os dados obtidos foram plotados utilizando-se o software Origin Pro 8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das penas *in natura*, queratina e nanoqueratina obtidas

As penas e a queratina obtida foram caracterizadas quanto a sua composição química percentual. A nanoqueratina apresentou-se na forma de uma suspensão coloidal estável conforme pode ser visto na Figura 7, a qual foi submetida a medida de potencial Zeta e distribuição de tamanho de partículas, tendo sido posteriormente liofilizada para a realização das análises de FTIR, MEV e TGA. As propriedades estudadas foram estabilidade em suspensão, tamanho de partículas, morfologia e estabilidade térmica, caracterização dos grupos funcionais e a adequação das mesmas em relação ao que se espera da nanoqueratina para o preparo de um hidrogel para cultura de tecidos.

Figura 7 - Nanoqueratina em suspensão (a), nanoqueratina liofilizada (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.1. Composição da queratina

A determinação dos teores destes constituintes foi realizada antes e após o processo de extração com o intuito de avaliar a eficiência das etapas de purificação. As penas de frango apresentam-se como sendo constituídas basicamente de proteínas, lipídeos, umidade e cinzas. A Tabela 4 apresenta os teores obtidos em porcentagem para estes constituintes. Os valores obtidos para o teor de proteína bruta e cinzas nas penas de frango *in natura* estão próximos dos 84% e 2% encontrados por Sinhorini (2013), e ressaltam o alto teor de proteínas presente nas

penas, responsável pelo seu potencial de utilização para o preparo de hidrogéis que mimetizam a matriz extracelular. Foi possível constatar um acréscimo de 13,2% no teor de lipídeos da queratina obtida se comparado ao valor das penas. Tal fato está relacionado a acumulação deste constituinte ao longo do processo de extração e purificação da queratina, uma vez que os lipídeos não permeiam a membrana de diálise, bem como, não são removidos durante as lavagens de neutralização ou durante a precipitação, passando a representar um maior percentual ao final do processo. O teor de 71% de proteína para a queratina obtida, indica adequação do produto para incorporação no preparo dos hidrogéis para cultura de tecidos.

Tabela 5 – Valores médios percentuais de proteínas, lipídeos e umidade das amostras.

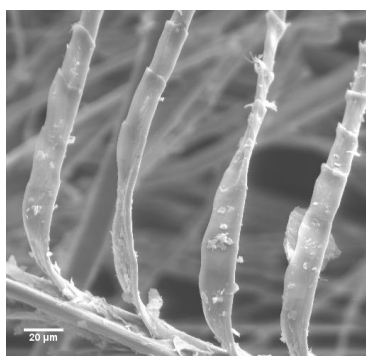
Amostra	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Penas de Frango	78,0 ± 0,9	2,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	10,0 ± 0,3
Queratina	71,3 ± 0,3	15,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0	5,4 ± 0,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

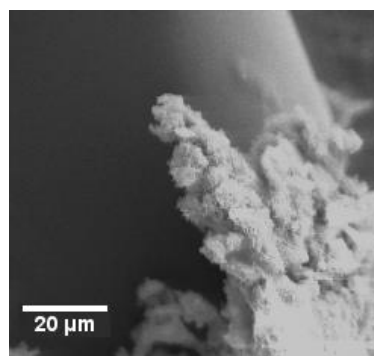
5.1.2. MEV

As micrografias a seguir (Figura 8a e 8b), mostram as mudanças ocorridas na microestrutura da pena após o processamento. A queratina obtida apresenta-se como agregados fibrosos de forma esférica e superfície mais exposta se comparada a estrutura filamentosa compacta apresentada pela pena, o que pode estar relacionado ao rompimento de pontes dissulfeto que mantinham a estrutura da pena durante a dissolução, levando a quebra dos filamentos em porções menores.

Figura 8 – Micrografia das penas de frango (a) e queratina liofilizada(b).



(a)



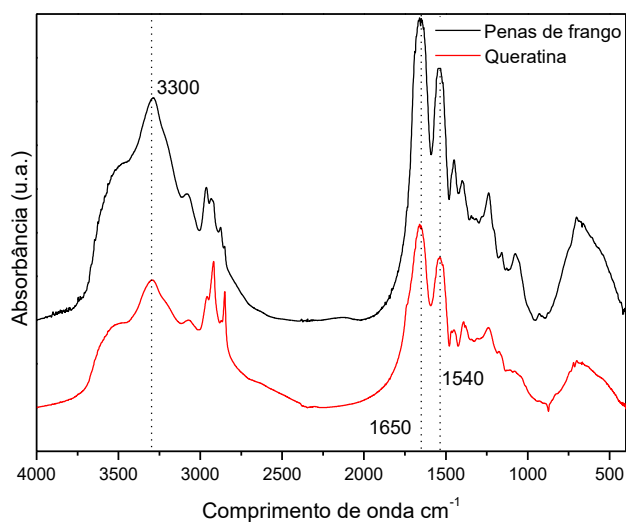
(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3. FTIR

A Figura 9 – apresenta o espectro de FTIR para as penas de frango e queratina obtida, sendo possível verificar bandas características de amins primárias em 3293 e 3401 cm^{-1} . As bandas em 1650 e 1653 são reportadas como sendo devido ao estiramento C=O de grupos amida, também conhecidos como amida I. As bandas em 1538 - 1540 cm^{-1} são reportados como resultado de dobramentos N-H resultantes da configuração β , típica de queratina de penas. As bandas em 1239 e 1243 cm^{-1} correspondem a vibrações típicas de proteínas conhecidas como amida III, resultante de estiramento vibracional de ligações C-N, tendo apresentado também a banda conhecida como amida II, resultante de dobramento de ligações N-H. As bandas em 630 e 625 cm^{-1} são reportadas como sendo devido a presença de ligações C-S. Através do espectro pode ser observado uma diminuição na banda relacionada a estiramentos das ligações S-S entre 500 e 540 cm^{-1} para a queratina, estando relacionada ao rompimento das pontes dissulfeto quando da dissolução das penas pelo hidróxido de sódio (SARAVANAN *et al.*, 2013).

Figura 9 – Espectro de FTIR das penas de frango e queratina.



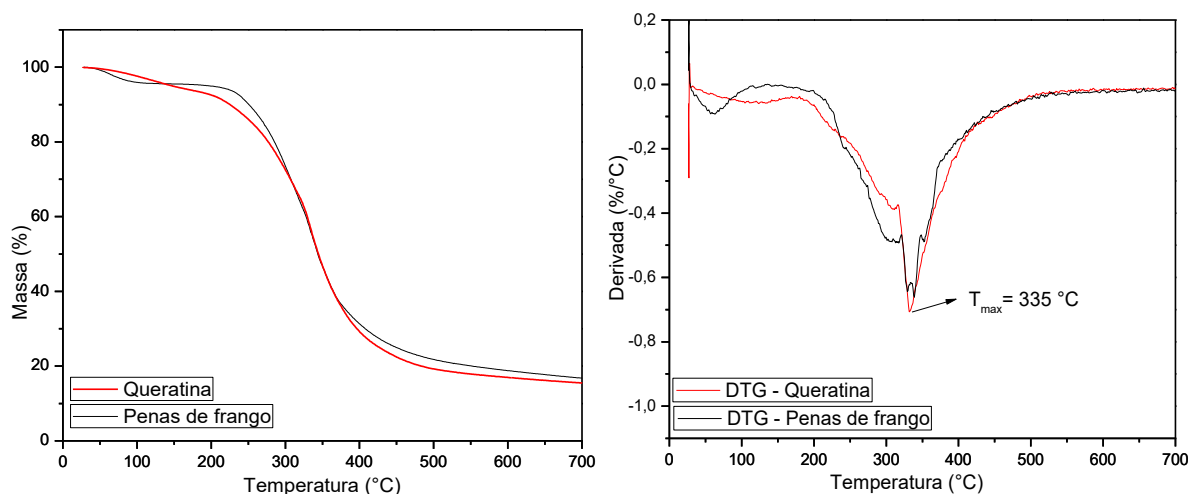
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.4. Caracterização térmica da queratina.

A partir da análise termogravimétrica da queratina e das penas, foi possível verificar se o processo de extração promoveu alterações na estabilidade térmica do produto final. A Figura

10 apresenta o gráfico da análise possibilitando a visualização de eventos de perda de massa em função da temperatura.

Figura 10 - Gráfico de TGA (Esquerda) e DTG da queratina e das penas de frango.



Fonte: Elaborada pelo autor.

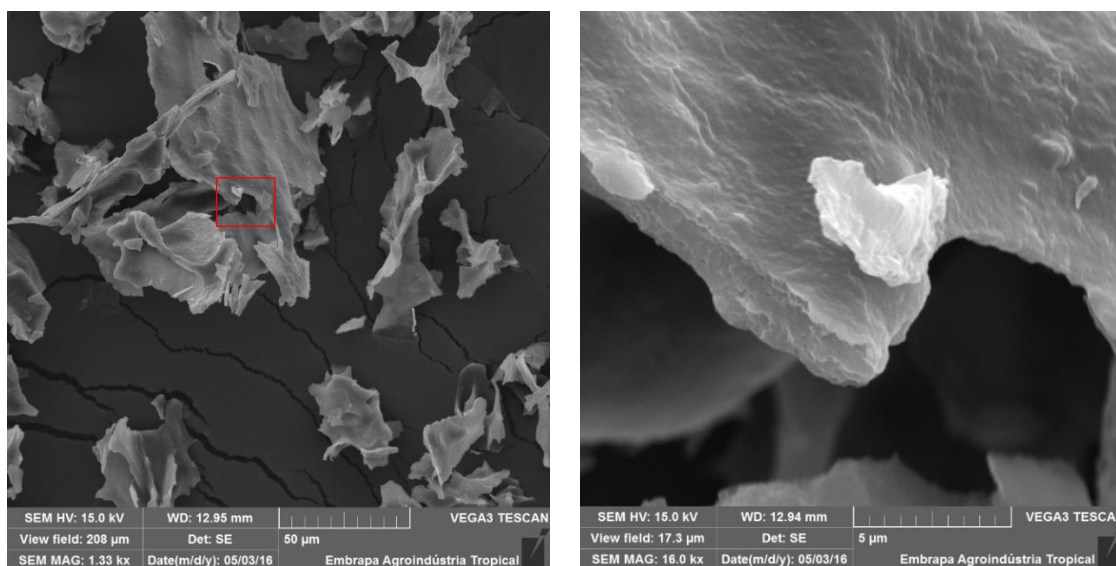
A queratina apresenta uma curva de perda mássica muito similar àquela do material inicial, evidenciando pouca alteração estrutural em função do método de extração. Inicialmente ocorre um evento de perda mássica entre 50 e 100 °C nas penas e na queratina, sendo comumente associado com perda de umidade incorporada na amostra. A magnitude deste evento em ambas amostras é corroborada pelo maior teor de umidade inicialmente presente nas penas, em relação a queratina liofilizada. As duas amostras apresentaram evento de degradação da estrutura proteica se iniciando em 200 °C e se prolongando até aproximadamente 400 °C, este evento se relaciona com o rompimento de ligações dissulfeto, quebra de ligações peptídicas e decomposição da estrutura proteica em compostos voláteis como H_2S , CO_2 , HCN e H_2O . Queratina e penas, ambas apresentaram no gráfico de DTG um pico máximo de perda mássica em torno da mesma temperatura, 335 °C, indicando pouca influência do método de extração na estabilidade térmica da queratina. A partir de 500 °C a massa residual na amostra de penas se mostra superior a de queratina, evidenciando novamente um maior teor de matéria inorgânica presente nas penas se comparado a queratina.

5.2. Caracterização da nanoqueratina obtida através do método de dessolvatação.

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura para visualizar a microestrutura e a superfície da nanoqueratina liofilizada. A Figura 11 apresenta a micrografia da nanoqueratina obtida. A nanoqueratina apresentou-se na forma de folhas de diversos tamanhos com superfície rugosa e espessura de aproximadamente 200 nm. Saravanan *et al.*, (2013), obteve nanopartículas de queratina a partir de processo semelhante, que apresentaram morfologia esférica, o que leva a crer que o aspecto laminar da nanoqueratina obtida pode ser o resultado de agregação das nanopartículas resultante do processo de liofilização, que levou a obtenção de um filme.

Figura 11 - Micrografia da nanoqueratina liofilizada.

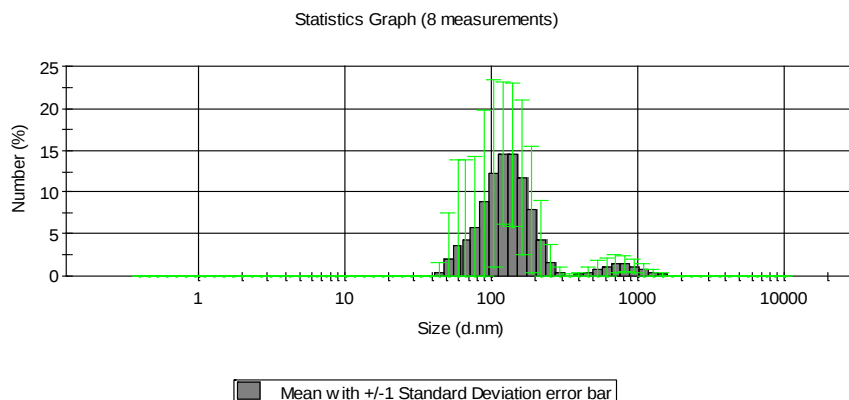


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Tamanho de partícula.

Com o uso da análise de tamanho de partículas foi possível observar a distribuição de tamanho das partículas de queratina, a qual está ilustrada através do gráfico apresentado pela Figura 12. O tamanho médio das partículas obtido por média ponderada foi de 167 nm, sendo que parte significativa se encontra por volta de 100 nm. Este resultado evidencia a efetiva obtenção de partículas de queratina na escala nanométrica e comprova a eficiência do método de dessolvatação empregado para obtenção de partículas de proteína na escala nanométrica.

Figura 12 - Distribuição do tamanho das partículas de queratina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.3 Potencial Zeta

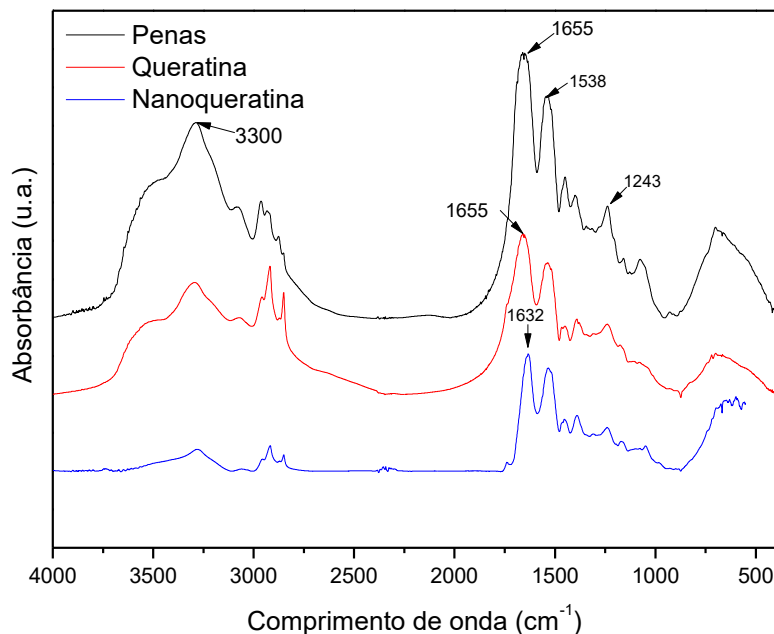
Através da análise de potencial zeta foi possível verificar a estabilidade da suspensão coloidal. A amostra de nanoqueratina obteve um valor médio de potencial de -32,36 mV, valor este, considerado como indicativo de boa dispersão das partículas em solução, já que segundo o reportado por Mirhosseini (2008), valores superiores, a 25 mV, em módulo, indicam uma suspensão com estabilidade e sem floculação.

5.2.4 FTIR

A análise de FTIR da nanoqueratina foi realizada na tentativa de avaliar as modificações estruturais provocadas no processo de dessolvatação e reticulação da nanoqueratina. Logo abaixo, na Figura 13 está apresentado o espectro de FTIR das penas, queratina e nanoqueratina. Foi observada uma banda em 1538 cm^{-1} conhecida como amida II, característica de dobramento N-H de proteínas. Já a banda conhecida como amida I, relativa ao estiramento vibracional de ligações C=O dos grupos amida. A banda amida I também é particularmente sensível a estrutura secundária das proteínas, aparecendo em 1655 cm^{-1} nas penas e na queratina, enquanto na amostra de nanoqueratina apresenta leve deslocamento, indo para 1632 cm^{-1} , o que segundo a literatura pode ser considerado como o resultado da ampliação de zonas com configuração β , já que a queratina também apresenta porções minoritárias de configuração α -hélice (YU *et al.*, 2004). Outra mudança bastante perceptível no espectro da nanoqueratina está na diminuição da banda amida A, presente em 3300 cm^{-1} , que segundo Martinez-Hernandez *et al.*, (2005), está relacionada a presença de regiões α -hélice ordenadas e corresponde estiramentos simétricos de ligações N-H. Tal diminuição pode também estar

relacionada a forma pela qual o glutaraldeído realiza as ligações cruzadas, que segundo a literatura, se dá principalmente através da formação de bases de shiff com os grupos amino das proteínas, tendo em função disto, reduzido a disponibilidade destes grupos. (COSTA JÚNIOR e MANSUR, 2008); (HABEEB e HIRAMOTO, 1968).

Figura 13 – Espectro de FTIR das penas de frango, queratina e nanoqueratina.

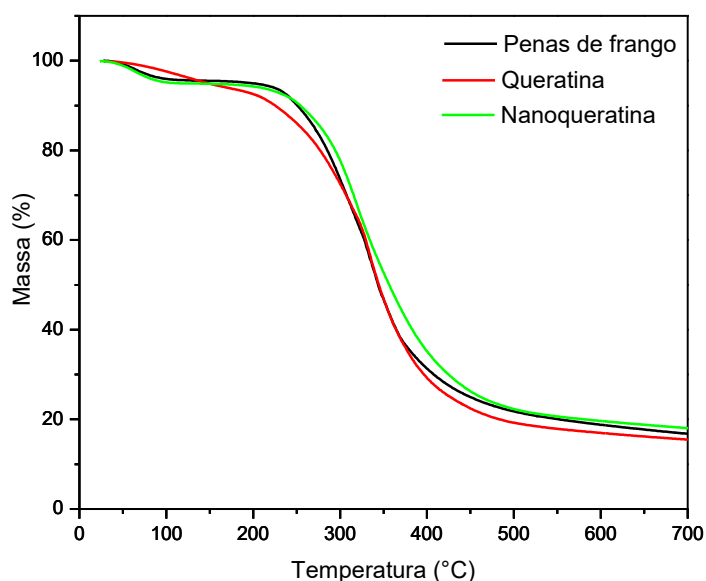


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.5 TGA

A partir da análise termogravimétrica da nanoqueratina, foi possível verificar de que forma o processo de dessolvatação e reticulação alterou a estabilidade térmica do produto final. A Figura 14 apresenta o gráfico da análise possibilitando a visualização da perda mássica em função da temperatura.

Figura 14 – Gráfico de TGA (esquerda) e DTG (direita) das penas, queratina e nanoqueratina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Através dos termogramas das amostras estudadas, é possível constatar grande similaridade em termos de estabilidade térmica, portanto, o processo de obtenção da nanoqueratina como um todo parece não influenciado significativamente na sua estabilidade térmica. Tem-se um evento de perda de aproximadamente 80% de massa, evento este que se relaciona, como já mencionado anteriormente com o rompimento de ligações dissulfeto, quebra de ligações peptídicas, e degradação da estrutura proteica. Este evento, na amostra de queratina, acontece em uma temperatura ligeiramente inferior a queratina, o que pode estar relacionado com o rompimento das ligações dissulfeto e ligações de hidrogênio que dão mais estabilidade a estrutura proteica, já no caso da nanoqueratina, este mesmo evento se inicia em um patamar de temperatura ligeiramente superior ao das penas, o que pode estar relacionado ao processo de reticulação, promovido pelo glutaraldeído na etapa de preparo da nanoqueratina, ou seja, com mais ligações cruzadas a proteína se torna mais estável termicamente, necessitando de mais energia térmica para a desnaturação e decomposição térmica da estrutura proteica.

5.3 Caracterização do resíduo ósseo de frango

Os ossos de frango são compostos majoritariamente por proteínas, lipídeos e bioapatita, possuindo também em menor concentração, sulfato de condroitina, sulfato de queratina e alguns elementos como Na e Mg incorporados na estrutura (Šupová, 2014). Em

função disto, os ossos tiveram o teor dos constituintes majoritários determinados ao longo do processo de extração. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 5. Os ossos *in natura* apresentaram teor de cinzas de 33,3%, valor dentro da faixa encontrada na literatura também para frangos de granja de 23-35%. Deve-se levar em consideração que o teor de matéria inorgânica nos ossos varia em função da idade e da disponibilidade de fósforo e cálcio na dieta do animal (RUNHO *et al.*, 2001). Após a etapa de desengorduramento, os ossos apresentaram teor de lipídeos de $4,6 \pm 0,1$ %, ou seja, houve uma redução de aproximadamente 20% no teor de lipídeos, tal valor pode ser compreendido como um indicativo de boa eficiência do processo de delipidação e sugere que a mistura acetona:éter (3:2) possui polaridade adequada à remoção dos lipídeos presentes nos ossos de frango. A remoção dos constituintes orgânicos presentes nos ossos contribui para obtenção de uma bioapatita de maior pureza, reduzindo assim, o risco de ocorrência de resposta imunológica por parte do organismo receptor do biomaterial.

Tabela 6 – Composição percentual média dos ossos *in natura*.

Amostra	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)
Ossos <i>in natura</i>	$33,3 \pm 0,3$	$36,7 \pm 2,0$	$24,9 \pm 1,3$

Fonte: Elaborada pelo autor.

As etapas de remoção dos constituintes orgânicos também tornam a utilização de temperaturas elevadas dispensável na etapa de calcinação, o que pode significar a preservação do teor de carbonato da bioapatita, bem como, a manutenção de sua estrutura e composição, evitando degradação e a formação de fases secundárias indesejáveis. Após o processo de desproteinização, o teor de proteína remanescente nas duas bioapatitas foi determinado, a fim de avaliar qual condição teria apresentado maior eficiência. Os valores estão expressos em percentagem na tabela 7. A partir dos valores obtidos é possível concluir que a proporção de massa de ossos: volume de solução não teve influência significativa sobre a eficiência do processo de remoção de proteínas. Podendo as duas condições serem consideradas como potencialmente aplicáveis ao processo de extração da bioapatita.

Tabela 7 - Teor de proteínas nas amostras de ossos desproteinizados (O.D.).

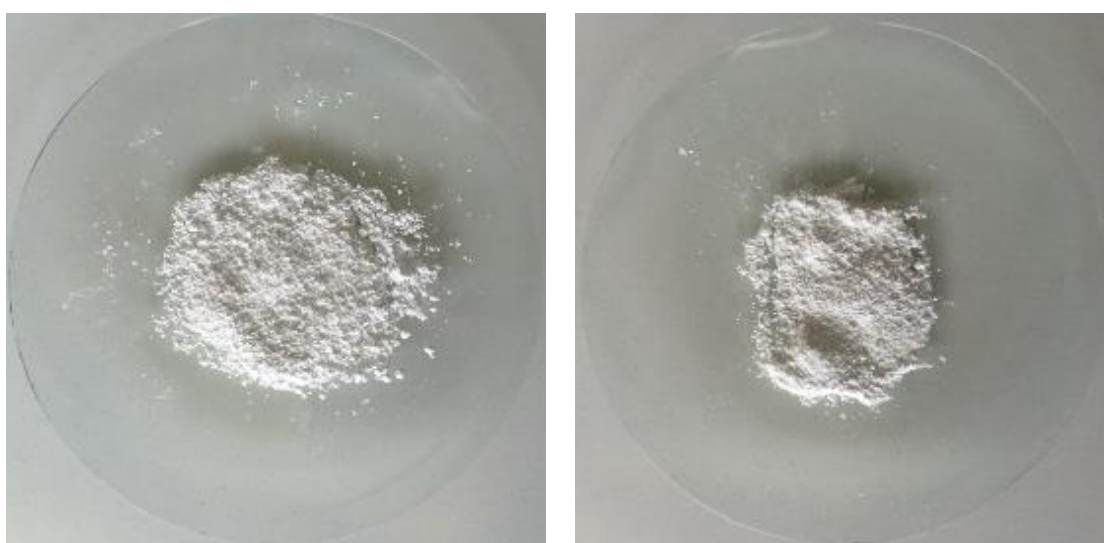
Amostra	O.D. 1 (%)	O.D. 2 (%)
Teor de proteínas	$0,8 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1$

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Caracterização das Bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino

Ao final do processo de extração, obteve-se as bioapatitas 1 e 2 como resultado da calcinação das amostras de ossos desproteinizados, O.D. 1 e O.D. 2. As bioapatitas obtidas estão apresentadas na Figura 15 (a e b). Todas as amostras apresentaram-se macroscopicamente enquanto pós brancos de granulometria fina, o que pode ser considerado como evidência da remoção dos constituintes orgânicos presentes anteriormente no osso.

Figura 15 - Bioapatitas 1-2.



(a) Bioapatita 1

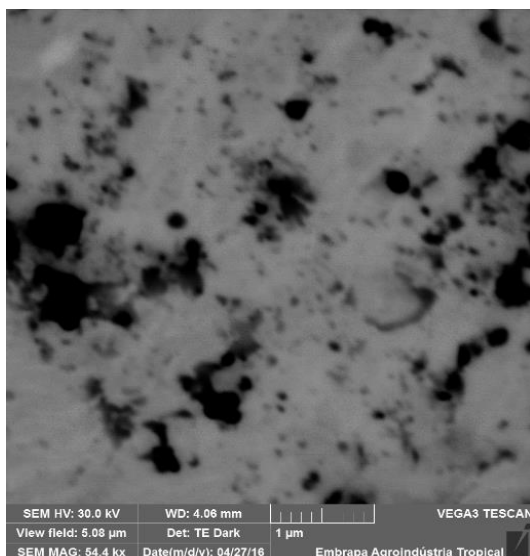
(b) Bioapatita 2

Fonte: Elaborada pelo autor.

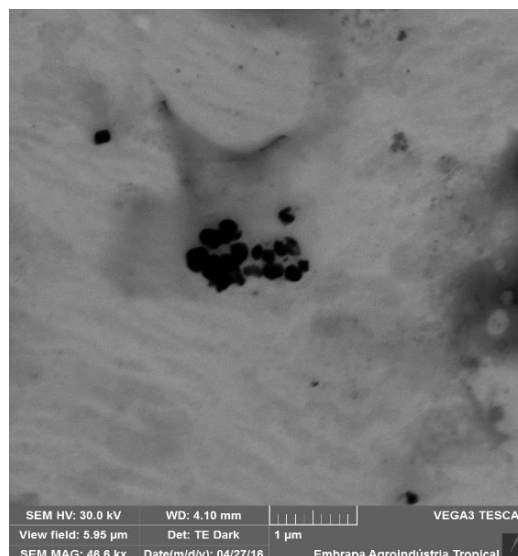
5.4.1. Microscopia eletrônica de transmissão das bioapatitas (MET) das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino

Através da microscopia eletrônica foi possível verificar a existência de possíveis diferenças estruturais e superficiais promovidas pelo tratamento com NaOH. Na figura 16 são mostradas as micrografias das Bioapatias 1-2.

Figura 16 – Micrografia das bioapatitas 1 e 2.



Bioapatita Ex.1



Bioapatita Ex.2

Fonte: Elaborada pelo autor.

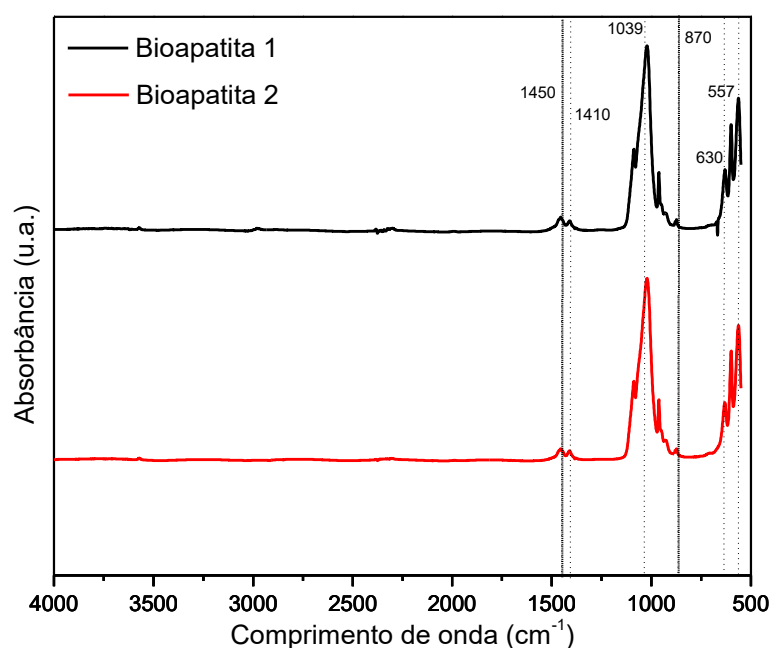
As partículas obtidas de bioapatita apresentaram-se em formato granular, sendo em sua maioria de escala submicrométrica, e uma minoria em escala nanométrica (menores que 100nm). Šupová *et al.* (2011), obtiveram, através de processo semelhante, partículas de bioapatita menores que 100 nm em forma de agulha. A literatura atribui o tamanho dos cristais obtidos ao tempo e temperatura na etapa de calcinação, sendo um maior tempo ou temperatura os fatores responsáveis pela aglomeração de cristais levando a obtenção de partículas de maior tamanho. No entanto, a dependência do formato dos cristais com a metodologia do processo de obtenção ainda não está claramente estabelecida na literatura (ŠUPOVÁ *et al.*, 2014).

5.4.2 FTIR das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino

Através da análise de FTIR foram obtidos os espectros apresentados na Figura 17, de onde foi possível verificar a existência de possíveis mudanças estruturais nas bioapatitas em função do procedimento de desproteinização utilizado. Todas as amostras apresentaram-se livres de matéria orgânica, não sendo possível a observação de bandas referentes aos demais constituintes do osso, o que corrobora com os resultados apresentados por Armstrong e Singer (1965), em que se constata a completa remoção dos constituintes orgânicos presentes no osso após calcinação de 18h a uma temperatura de 700 °C. A banda em 870 cm⁻¹ referente a presença de carbonato como substituição do tipo B (quando parte dos grupos PO₄³⁻ são substituídos por CO₃²⁻ na estrutura cristalina), logo ao lado, em 878 cm⁻¹, há uma banda um pouco menor

referente a substituição de carbonato do tipo A (quando grupos OH^- são substituídos por carbonato), no entanto, a literatura reporta que na apatita biológica as substituições do tipo B, em geral, são predominantes (ELLIOTT, 2002). A presença de substituições de carbonato na apatita está diretamente relacionada ao aumento na solubilidade, sendo, portanto, mais facilmente absorvível pelas células vivas em comparação com HA estequiométrica, o que pode potencializar sua bioatividade, sendo por isso, comumente denominadas bioapatitas. (MERY *et al.*, 1998). Pasteris *et al.*, (2004).

Figura 17 – Espectro de FTIR das bioapatitas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os teores de carbonato apresentados na Tabela 8 foram calculados a partir do espectro de FTIR segundo a fórmula dada na seção 4.2.13. Diferentemente da hidroxiapatita estequiométrica, as apatitas biológicas apresentam uma série de substituintes que lhe conferem melhores propriedades frente as aplicações biomédicas, um dos principais substituintes presentes nas mesmas é o carbonato, estando presente na fase mineral do osso humano em uma concentração de cerca de 5-8% (MERY *et al.*, 1998). As bioapatitas extraídas do resíduo ósseo de frango apresentaram teor de carbonato de 5,02%, sendo que valores superiores a 3,11%, reportado na literatura para bioapatita extraída a partir de ossos de fêmur de frango (ŠUPOVÁ *et al.*, 2011), e a 4,4% obtido para bioapatita extraída a partir de tíbia bovina, ambos com o uso do método hidrotérmico alcalino (MURUGAN *et al.*, 2003). Este resultado mostra que as

bioapatitas obtidas apresentam características adequadas à utilização para aplicações biomédicas.

Tabela 8 - Teores de carbonato das bioapatitas.

Amostra	Bioapatita 1	Bioapatita 3
Teor de carbonato (%)	5,02 ± 0,5	5,02 ± 0,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Principais bandas observadas no espectro de infravermelho das bioapatitas.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupamento	Referência
557 e 600	Deformação angular do grupo (PO ₄ ³⁻)	Figueiredo <i>et al.</i> (2012)
630 e 3570	Estiramento vibracional de grupos OH ⁻	Pasteris <i>et al.</i> (2004)
870, 1410 e 1450	Estiramento vibracional de CO ₃ ²⁻	Figueiredo <i>et al.</i> (2012)
960 e 1012	Estiramento vibracional do grupo (PO ₄ ³⁻)	Figueiredo <i>et al.</i> (2012)
1039	Estiramento vibracional do grupo (PO ₄ ³⁻)	Figueiredo <i>et al.</i> (2012)

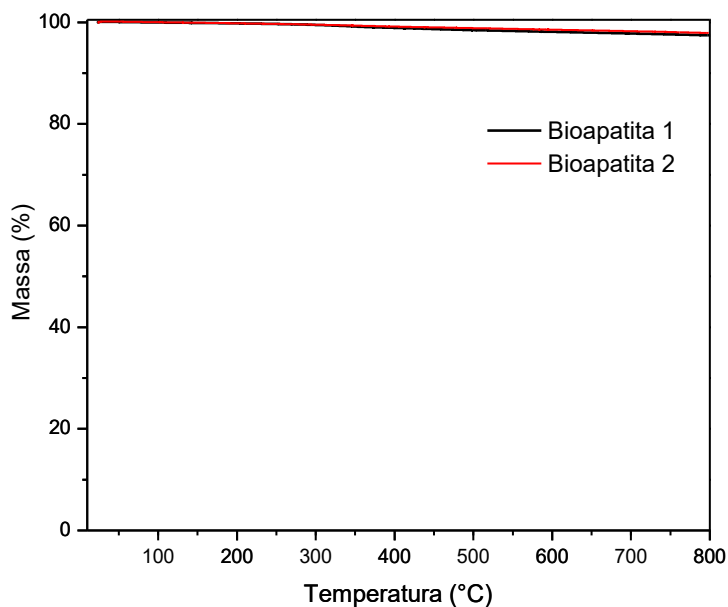
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.3 TGA das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino

Empregou-se a análise termogravimétrica para verificar a presença de impurezas orgânicas remanescentes que possam estar associadas a estrutura das bioapatitas. Através da curva de TGA apresentada na Figura 18 foi possível acompanhar a porcentagem de perda de massa das amostras (Bioapatitas 1 e 2) em função do aumento da temperatura. Até os 310 °C ocorre perda de massa progressivamente, equivalendo a 0,5% de massa de ambas as amostras. Este valor pode ser considerado um indicativo da presença de matéria orgânica remanescente agregada na estrutura das bioapatitas. A partir dos 310 °C, as amostras começam a apresentar percentagens de perda de massa diferentes, até atingirem, ao final da corrida, o equivalente a 2,1% para a bioapatita 2 e 2,5% de perda mássica para a bioapatita 1. Segundo Joschek *et al.* (2000), a decomposição do carbonato presente na estrutura das apatitas se inicia por volta de 360 °C em atmosfera oxidativa. Estes valores levam a crer que as perdas mássicas que se

acentuam a partir desta temperatura em ambas as amostras estão relacionadas a decomposição de parte do carbonato evidenciado pelo espectro de FTIR presente na estrutura das bioapatitas.

Figura 18 – Gráfico de análise termogravimétrica das Bioapatitas.

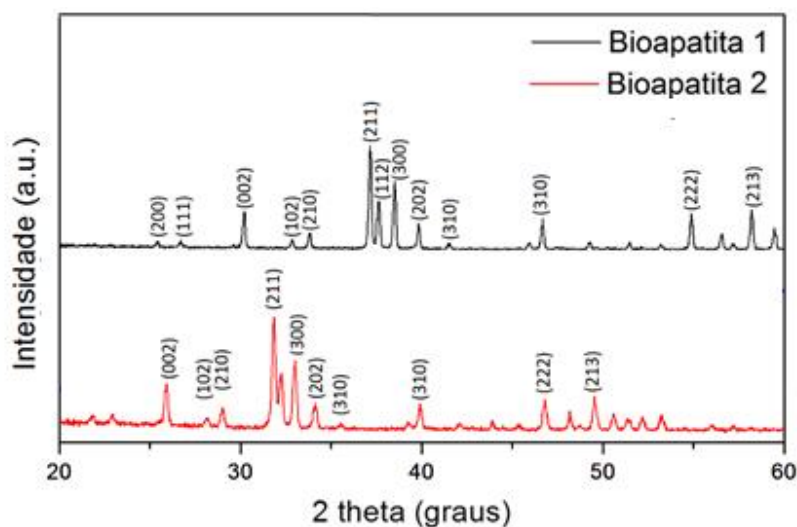


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.4 DRX das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino

A Figura 19 apresenta os difratogramas obtidos para as bioapatitas 1 e 2. Os espectros apresentaram picos estreito e bem definidos, forma característica de um alto índice de cristalinidade. Os picos apresentaram alto grau de correlação com os picos característicos de hidroxiapatita encontrados na base de dados PDF-2 do Internacional Center for Diffraction Data (ICDD), tendo como padrão a ficha 01-082-1943.

Figura 19 - Difratoograma das bioapatitas 1 e 2.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos difratogramas foi possível obter o valor dos índices de cristalinidade das amostras de bioapatita. A tabela 10, apresenta os valores obtidos.

Tabela 10 – Índices de cristalinidade das amostras de bioapatita 1 e 2.

Amostra	Bioapatita 1	Bioapatita 2
Índice de cristalinidade (%)	95	85

Fonte: Elaborada pelo autor.

As duas amostras apresentaram altos índices de cristalinidade, resultado este, que indica eficiência na remoção de componentes orgânicos, uma vez que os mesmos, quando presentes, contribuem com regiões amorfas. A bioapatita 1 a qual foi desproteïnizada utilizando-se a proporção de 1:20 de massa de osso para solução de NaOH, apresentou maior índice de cristalinidade se comparada a bioapatitas 2, desproteïnizada utilizando-se proporção de 1:40. Vale ressaltar, que a relação entre as condições de desproteïnização e as características das bioapatitas obtidas, não estão claramente estabelecidas na literatura. Giraldo-Betancur *et al.* (2013), obtém bioapatita a partir de osso bovino por calcinação direta a 900 °C com índice de cristalinidade de 88,3%, e por tratamento alcalino seguido de calcinação com 80,2%. Valores que se assemelham ao obtido através do método hidrotérmico alcalino.

5.4.5 EDS das bioapatitas obtidas pelo método hidrotérmico alcalino

A análise de EDS foi realizada com o intuito de avaliar qualitativamente a razão molar Ca/P das bioapatitas obtidas a partir das 2 condições estudadas, os valores obtidos estão apresentados na Tabela 11.

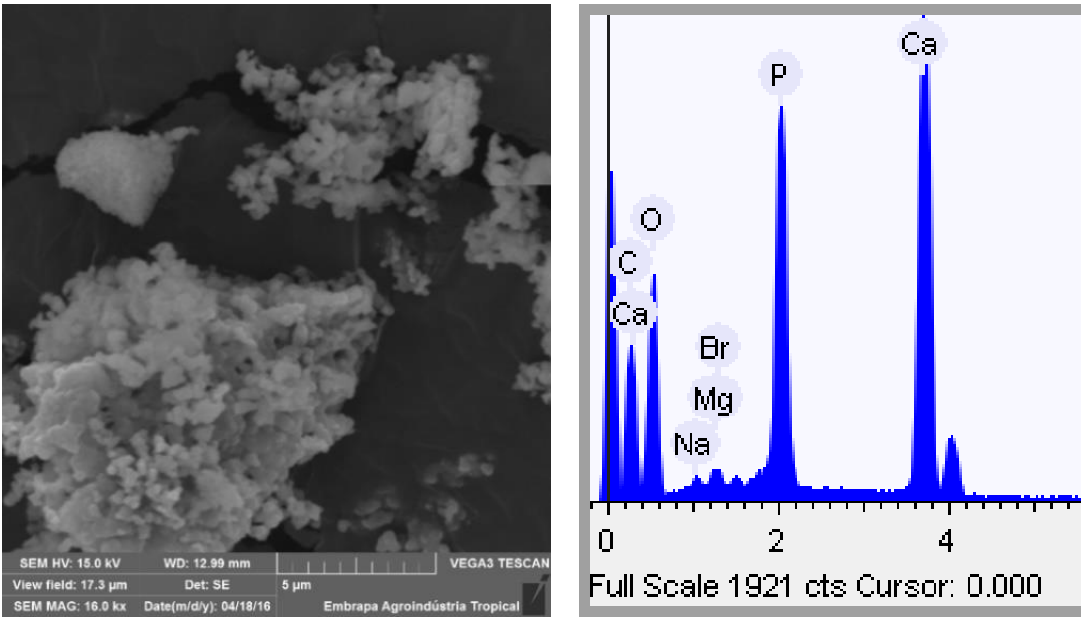
Tabela 11 – Relação molar Ca/P das bioapatitas 1 e 2.

Amostra	Bioapatita 1	Bioapatita 2
Relação Ca/P	1,54 ± 0,06	1,70 ± 0,06

Fonte: Elaborada pelo autor.

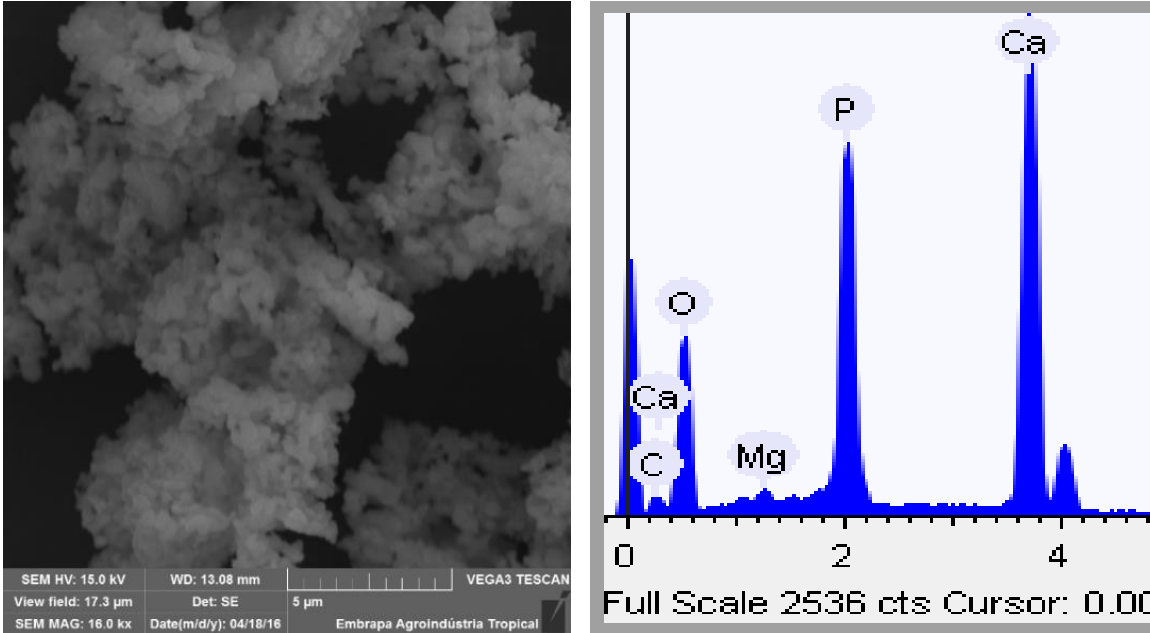
A bioapatita 1 apresentou razão molar Ca/P inferior ao esperado para hidroxiapatita estequiométrica, de 1,67, a redução está relacionada a existência de substituições do cálcio por cátions metálicos na estrutura cristalina da apatita, característica pela qual recebe a denominação de apatita cálcio deficiente. Em geral, as apatitas de origem biológica apresentam este tipo de substituição resultando em um valor inferior a 1,67. ŠUPOVÁ *et al.*, (2011), obteve bioapatita de ossos de frango a partir do método hidrotérmico alcalino com razão Ca/P de 1,64. A existência de algumas substituições na estrutura cristalina da bioapatita é tida como vantajosa em relação a HA pura, ou estequiométrica, uma vez que no osso humano tais substituições, ainda que da ordem de traços, são de fundamental importância nas reações bioquímicas associadas com o metabolismo do osso (ŠUPOVÁ *et al.*, 2011). Já a bioapatita 2 apresentou valor maior que 1,67, indicando composição estrutural rica em cálcio. Os espectros de EDS mostrados nas Figuras 20 e 21 apresentaram uma composição típica de apatitas biológicas, sendo majoritariamente constituídas de Ca e P, com a presença de elementos minoritários, normalmente aceita como sendo resultante das substituições que os mesmos ocupam na estrutura cristalina.

Figura 20 - a) Micrografia e (b) espectro de EDS da bioapatita 1.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - a) Micrografia e (b) espectro de EDS da bioapatita 2.



Fonte: Elaborada pelo autor.

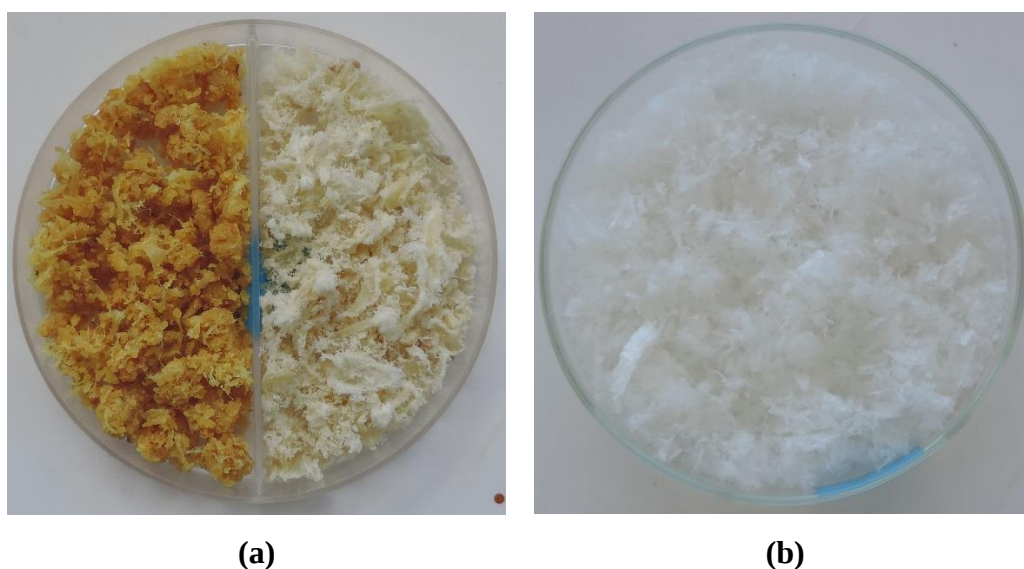
5.5 Caracterização do colágeno

O colágeno obtido foi submetido às caracterizações de MEV, FTIR, UV-Vis temperatura de desnaturação por viscosimetria com o intuito de caracterizar suas propriedades químicas, físicas e a adequação das mesmas aos requisitos para aplicações biomédicas. As propriedades estudadas foram temperatura de desnaturação, pureza e preservação da estrutura quaternária do colágeno.

5.5.1 Caracterização físico-química do material colagenoso

A caracterização do material *in natura* e após os tratamentos visa acompanhar a eficiência dos processos de purificação. A Figura 22 apresenta as peles e tendões antes e após os pré-tratamentos e o colágeno obtido. Os materiais apresentados na imagem abaixo encontram-se na forma como foram utilizados nos experimentos de caracterização.

Figura 22 – (a) Peles e tendões de frango *in natura*/Peles e tendões tratados, (b) colágeno obtido.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da imagem acima é possível observar uma mudança drástica na coloração das peles e tendões após a sequência de tratamento visando a remoção de lipídeos, proteínas

não colagenosas e minerais, o que pode ser considerado qualitativamente como um indicativo da eficiência dos processos utilizados. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos referentes a composição química de peles e tendões *in natura* e após os pré-tratamentos. Os valores estão condizentes com o reportado na literatura por Alves e Prudêncio-Ferreira, (2012), para peles e tendões de pés frango. Os autores obtiveram teores de cinzas, lipídeos e proteínas respectivamente de 0,6%, 39,8% e 64,1%. Vale lembrar que pequenas variações em relação aos valores obtidos neste trabalho podem estar relacionadas a idade e alimentação dos animais utilizados. O alto valor de proteínas e o baixo teor de cinzas apresentados pelo material *in natura* sugerem que o mesmo tem forte potencial para ser utilizado como fonte de colágeno. No entanto, os teores de lipídeos obtidos para o colágeno isolado e peles e tendões tratados, indicam pouca eficiência dos pré-tratamentos na remoção destes constituintes. Em relação ao teor de cinzas, os procedimentos de purificação adotados após a extração parecem ter sido mais eficientes na remoção destes constituintes, se comparado aos pré-tratamentos, uma vez que o material tratado e *in natura*, apresentaram valores de cinzas quase iguais, tendo reduzido apenas no produto final, o colágeno.

Tabela 12 – Composição química do material colagenoso.

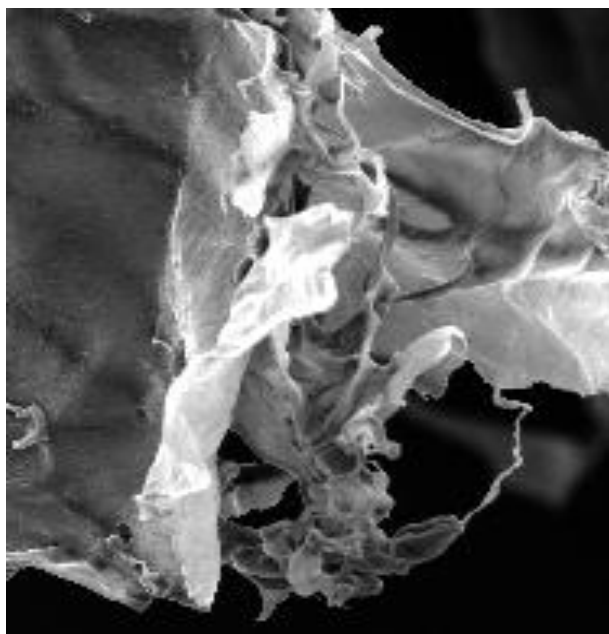
Amostra	Cinzas	Lipídeos	Proteínas
Peles e tendões de pés de frango	1,1 ± 0,1	36,7 ± 2,6	71,1 ± 1,7
Peles e tendões tratados	0,9 ± 0,1	23,6 ± 0,9	90,2 ± 5,1
Colágeno	0,0 ± 0,0	22,6 ± 0,9	84,0 ± 1,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5.2. MEV

A análise de microscopia eletrônica foi realizada com o intuito de observar a microestrutura e superfície do colágeno obtido. A Figura 23 mostra a micrografia do colágeno de peles e tendões de pés de frango.

Figura 23 – Micrografia do colágeno obtido de peles e tendões de frango.



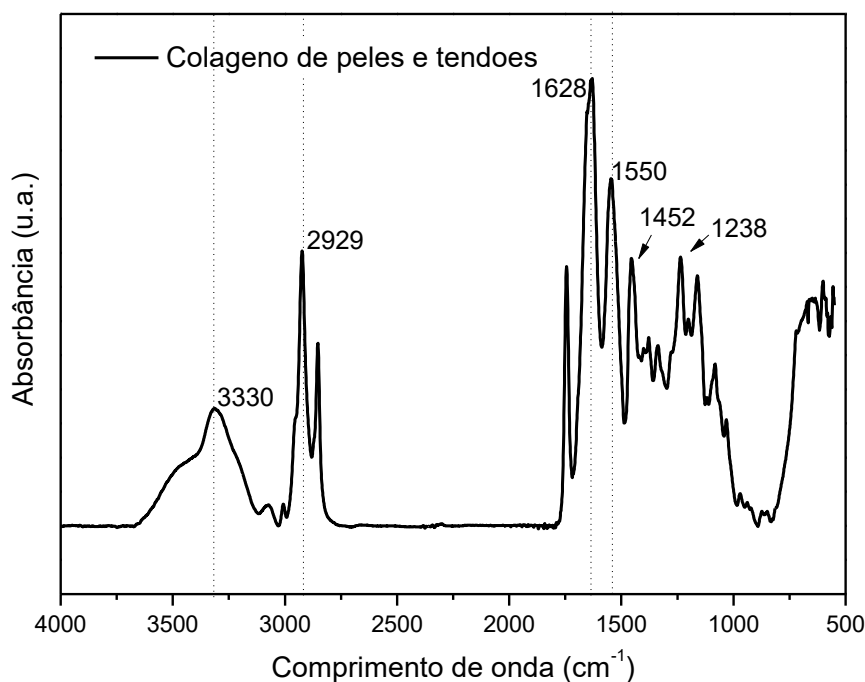
Fonte: Elaborada pelo autor.

A microestrutura apresentou aspecto filamentoso irregular, sendo estas características comuns a amostras de colágeno do tipo I, tais características são comumente reportadas como indicativos de alto potencial de absorção de água (TAMILMOZHI *et al.*, 2013). A superfície também apresentou aspecto limpo, evidenciando a remoção de proteínas não colagenosas inicialmente presentes na amostra, o que confirma qualitativamente a eficiência dos processos de remoção destes constituintes.

5.5.3 FTIR

A análise de FTIR foi realizada com o intuito de caracterizar os principais grupos funcionais presentes na amostra de colágeno e verificar a existência de alterações estruturais decorrentes do processo de extração. A Figura 24 apresenta o espectro do colágeno obtido de peles e tendões de frango.

Figura 24- Espectro de FTIR do colágeno extraído de peles e tendões.



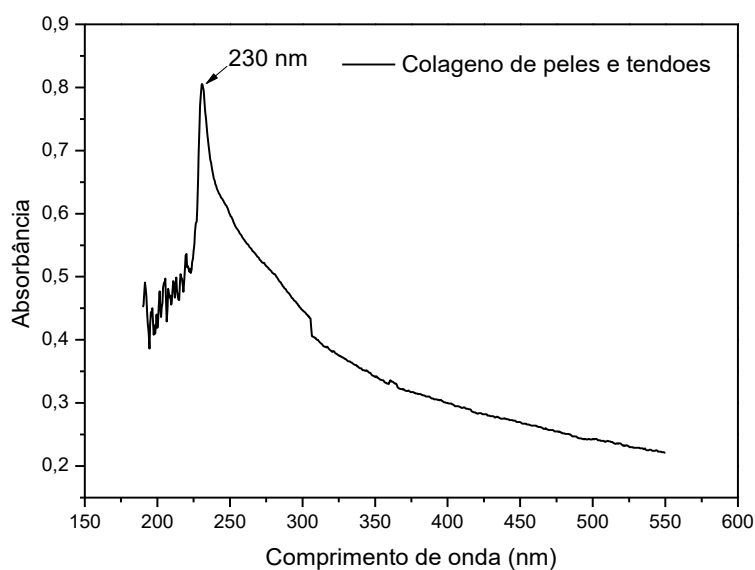
Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro apresentou bandas comuns a proteínas, tais como a banda Amida A, em 3300 cm^{-1} , associada a estiramentos vibracionais de ligações N-H, apresentando deslocamento de 3400 para 3300 cm^{-1} , relacionado com a existência de ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas. Amida I, em 1628 cm^{-1} , referente a estiramentos vibracionais de grupos carbonílicos. Amida II, em 1550 cm^{-1} , relacionada a deformação angular da ligação N-H. Segundo Ahmad e Benjakul, (2010), é possível verificar a integridade da tripla hélice do colágeno através da razão entre as absorvâncias da banda em 1238 cm^{-1} , denominada Amida III, associada ao estiramento vibracional de ligações C-N e da banda em 1452 cm^{-1} , associada a deformação de grupos C-H do anel pirrolidínico da prolina e da hidroxiprolina (VEERURAJ *et al.*, 2013). O valor de $A_{1238}/A_{1452} \geq 1$, indica integridade da tripla hélice no caso de colágeno extraído em solução ácida. Para a amostra de colágeno obtida o valor encontrado foi de 1,0, sendo um bom indicativo de manutenção da integridade tripla hélice.

5.5.4 UV-Vis

A análise de Espectroscopia de Absorção UV-VIS foi realizada com o intuito de verificar se houve a efetiva remoção de proteínas não colagenosas pelos processos de pré-tratamento aplicados, através do pico de absorção em 280 nm, que segundo a literatura está relacionado a presença de aminoácidos aromáticos como o triptofano, fenilalanina e a tirosina, presentes em vários tipos de proteínas não colagenosas (HUANG *et al.*, 2011). Estando ausentes ou em pequena quantidade, a banda em 280 nm fica ausente e sugere-se eficácia na etapa que visa a remoção dos demais tipos de proteínas. A Figura 25 apresenta o espectro de absorção UV-Vis para a amostra de colágeno. O mesmo autor, obteve colágeno de pele de lula com pico máximo de absorção em 230 nm, característico do colágeno tipo I e ausência do pico de absorção em 280 nm. (VEERURAJ *et al.*, 2015).

Figura 25- Espectro de absorção UV-VIS do colágeno de peles e tendões de frango.

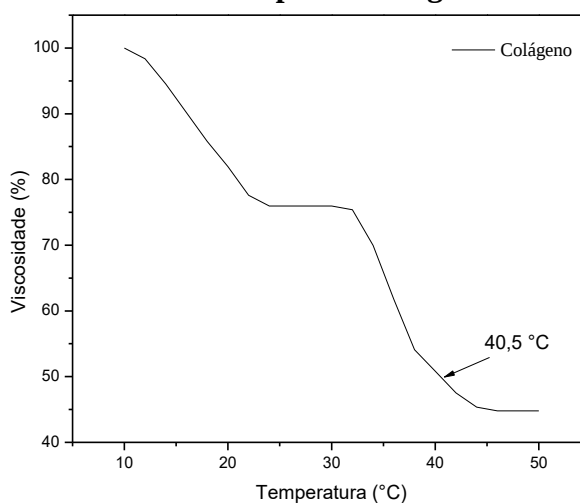


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5.5 Temperatura de desnaturação por viscosimetria

A determinação da temperatura de desnaturação por viscosimetria se baseia na progressiva diminuição da viscosidade do colágeno em solução, resultante do aumento no grau de agitação das moléculas. A temperatura na qual o colágeno inicia sua desnaturação (T_d) representa a transformação da estrutura de tripla hélice, a qual o colágeno se encontra na forma nativa, em estruturas espirais aleatórias e depende do número de ligações de hidrogênio e ligações cruzadas presentes na estrutura do colágeno (PIETRUCHA, 2005). A temperatura de início de desnaturação do colágeno é aceita como sendo a temperatura na qual a viscosidade cai para 50% do valor inicial. O valor de T_d de 40,5 °C obtido para o colágeno extraído por via enzimática de peles e tendões de frango está condizente com o valor de 41 °C reportado por Burjanadze (1982), para pele de frango. Os valores de temperatura de desnaturação reportados na literatura variam segundo a espécie da qual o colágeno foi extraído. (SENARATNE *et al.*, 2006). A espécie da qual o colágeno é proveniente se relaciona mais especificamente com o conteúdo de prolina e hidroxiprolina presente no tecido de origem. Em geral, colágenos com maiores teores destes dois aminoácidos possuem estabilidade térmica mais acentuada do que aqueles de menor teor (XU *et al.*, 2002). Isto se deve ao papel desempenhado pelas ligações de hidrogênio na manutenção da tripla hélice do colágeno, uma vez que, tais ligações são realizadas principalmente pelos grupamentos hidroxila e amino da hidroxiprolina (BABU; GANESH, 2001).

Figura 26 - Gráfico de temperatura de desnaturação para o colágeno obtido pele e tendões de pés de frango.



Fonte: Elaborada pelo autor.

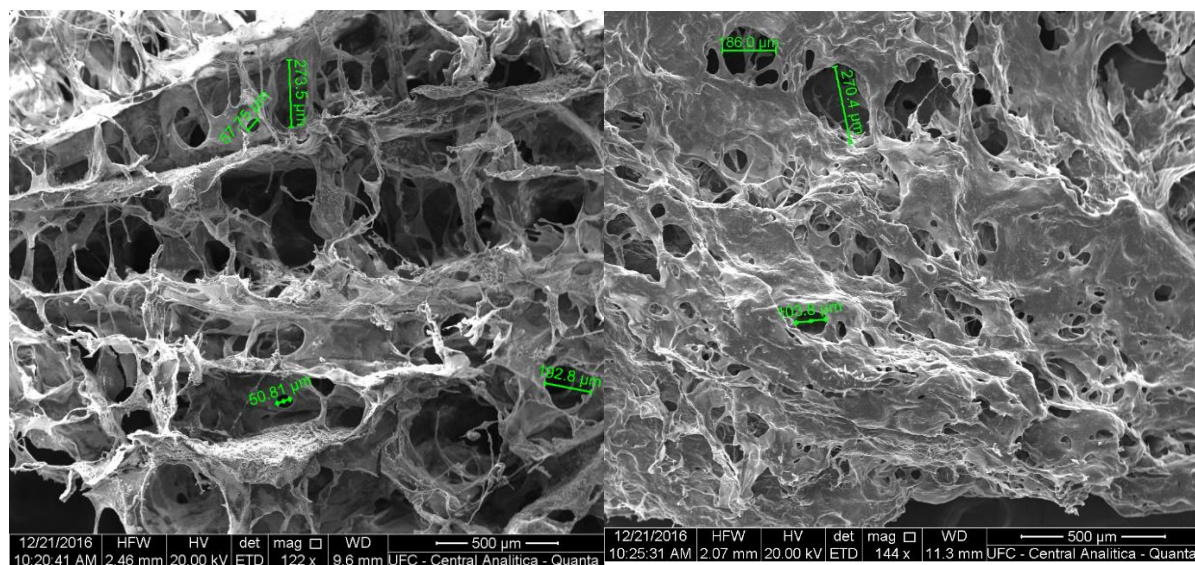
5.6 Caracterização dos hidrogéis de colágeno/bioapatita e nanoqueratina reticulados com UV/riboflavina

Os hidrogéis obtidos apresentaram consistência firme e capacidade de sofrer manipulação. Os mesmos foram submetidos a liofilização e em seguida às caracterizações de MEV, FTIR, TG e DSC com o intuito de caracterizar suas propriedades químicas e físicas e a adequação das mesmas em relação ao que se espera de um hidrogel para cultura de tecidos. As propriedades estudadas foram tamanho dos poros, interconexão de poros, homogeneidade dos constituintes, estabilidade térmica e preservação da estrutura quaternária do colágeno.

5.6.1 MEV

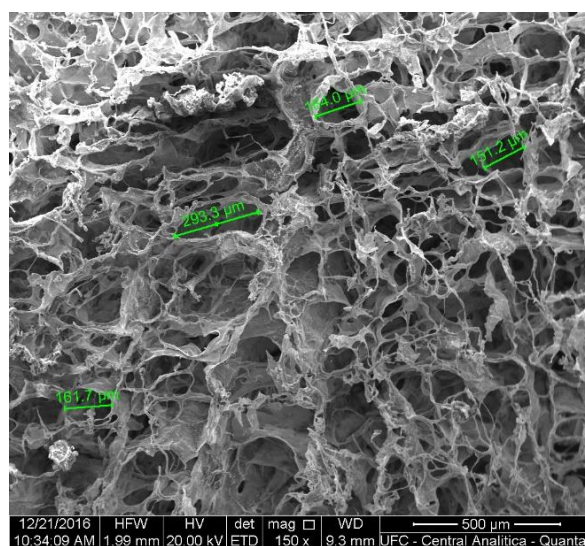
Através da análise de microscopia eletrônica foi possível observar a microestrutura dos hidrogéis em suas diferentes formulações, bem como, a influência da composição na porosidade e interconexão dos poros na rede polimérica. A Figura 27 apresenta as micrografias dos 4 hidrogéis após liofilização. Todos os hidrogéis obtidos apresentaram estrutura com elevada porosidade e interconexão entre os poros, características vitais para o desenvolvimento e proliferação celular, bem como, indicadoras da reticulação entre as fibrilas de colágeno. Como é possível observar nas micrografias, os hidrogéis apresentaram poros dispostos de formas variadas e tamanhos aleatórios, que variam de 50 μm até 379 μm sem padrão de distribuição. Em todos os casos em que houve a adição de nanoqueratina e hidroxiapatita os hidrogéis apresentaram-se mais densos e de menor porosidade, tal fato sugere que a adição destes componentes atribui características atrativas às fibrilas de colágeno, provocando a redução no espaçamento da estrutura interna das esponjas. No entanto, a composição em que os teores de nanoqueratina e hidroxiapatita não ultrapassam 5% parece ter atingido um equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas na superfície da estrutura, controlado o adensamento provocado pela adição dos reforços e conseguido manter uma melhor interconectividade entre os poros, se comparado aos demais hidrogéis onde foram adicionados reforços.

Figura 27 – Micrografia dos hidrogéis liofilizados

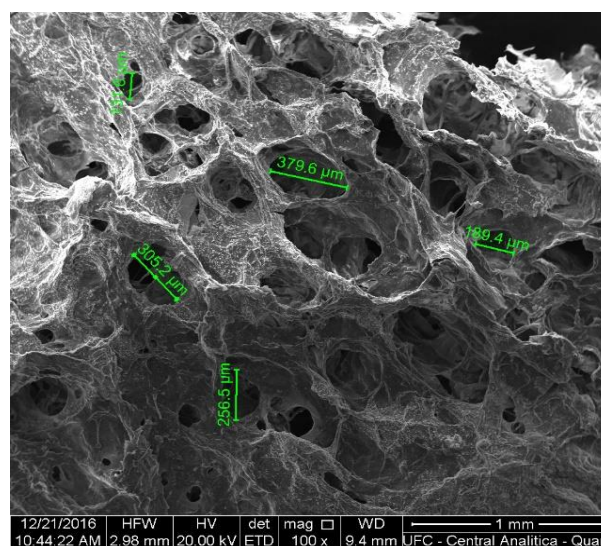


(a) C₁₀₀

(b) C₉₀NQ_{7,5}HA_{2,5}



(c) C₉₀NQ₅HA₅



(d) C₉₀NQ_{2,5}HA_{7,5}

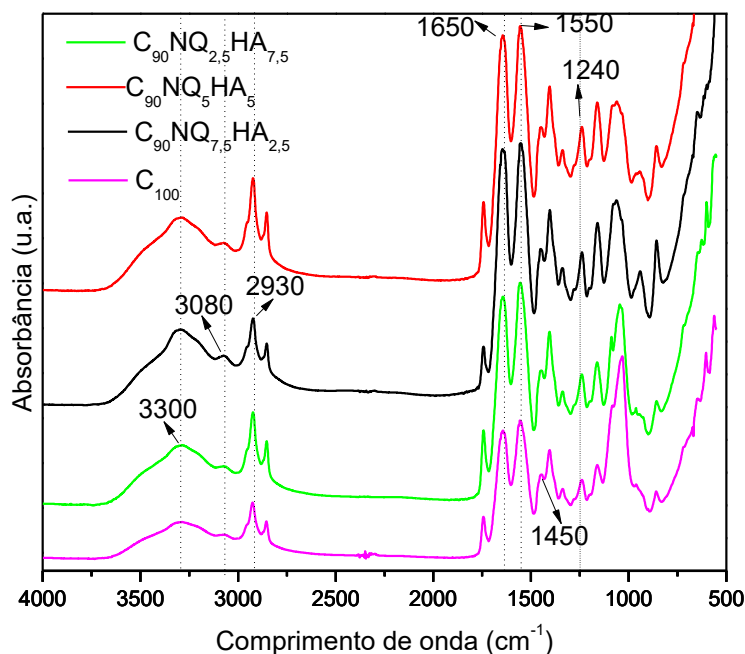
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6.2 FTIR

A análise de FTIR foi realizada com o intuito de observar as mudanças que ocorreram na estrutura química dos constituintes após a reticulação com riboflavina/UV. A seguir, a Figura 28 onde é possível observar o espectro de FTIR dos hidrogéis obtidos. Os espectros exibem perfis característicos de proteínas. Bandas como as já citadas Amida A ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$), Amida B ($\sim 3080 \text{ cm}^{-1}$), Amida I ($\sim 1630\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$), Amida II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$), E Amida III ($\sim 1280 \text{ cm}^{-1}$) aparecem em todos os espectro, no entanto, não foi observado

deslocamento significativo entre as mesmas em relação as diferentes composições (IAFISCO, 2012). A banda Amida A é reportada como possuidora de elevada sensibilidade em relação a força das ligações de hidrogênio, esta sofreu deslocamento em relação ao colágeno onde foi observada em 3330 cm^{-1} , enquanto nos hidrogéis seu pico máximo de absorção ficou situado em 3300 cm^{-1} . Valor este característico da fibra de colágeno na forma nativa. Este deslocamento na banda Amida A indica um maior grau de ordenação da estrutura do colágeno presente nos hidrogéis. Este fato sugere a efetividade da reticulação entre triplas hélices realizado pela riboflavina (HABERMEHL *et al.*, 2005; KRIM; BANDEKAR, 1986). Este maior ordenamento também é resultado da contribuição dada pela neutralização da solução de colágeno antes da reticulação (SKOPINSKA-WISNIEWSKA *et al.*, 2014). Como já mencionado anteriormente a razão entre as absorbâncias das bandas A_{1238}/A_{1452} é um parâmetro qualitativo utilizado para avaliar a manutenção da tripla hélice do colágeno. Os valores calculados da razão entre estas duas bandas para os hidrogéis obtidos foi de 1,02, 1,00, 1,03 e 1,01 para C_{100} , $C_{90}NQ_{7,5}HA_{2,5}$, $C_{90}NQ_5HA_5$, $C_{90}NQ_{2,5}HA_{7,5}$ respectivamente, sendo portanto, mais uma evidência qualitativa da manutenção da integridade da tripla hélice.

Figura 28 – Gráficos de FTIR dos hidrogéis obtidos por reticulação com riboflavina/UV.

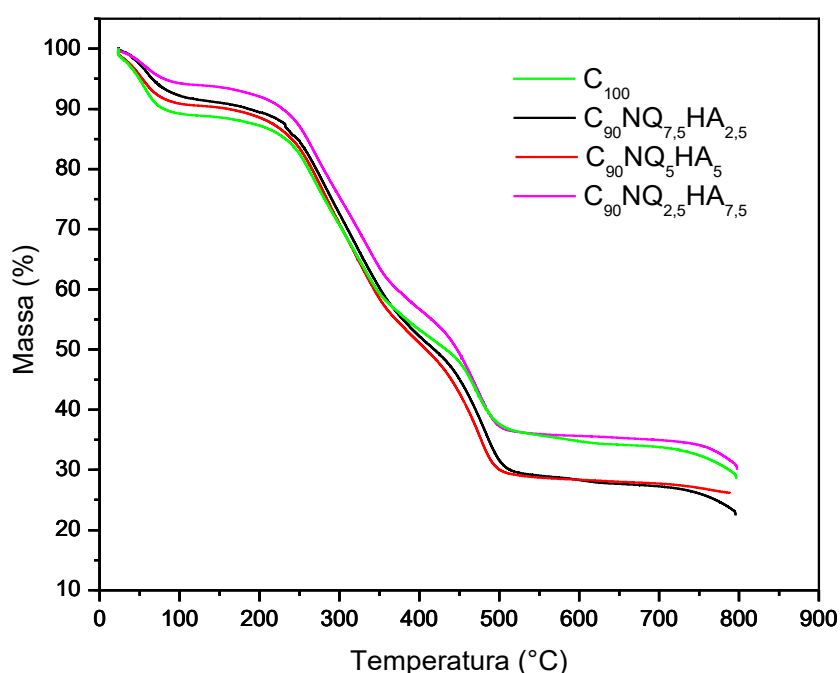


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6.3 TGA

A análise de TGA dos hidrogéis liofilizados foi realizada com o intuito de observar possíveis mudanças na estabilidade térmica em função da variação na composição dos mesmos. A figura 29 apresenta os termogramas dos hidrogéis obtidos. Todas as curvas de degradação térmica dos hidrogéis apresentaram comportamento semelhante, divergindo apenas no percentual de perda de massa relacionado a cada evento.

Figura 29 – Gráficos de TGA dos hidrogéis obtidos por reticulação com riboflavina/UV.



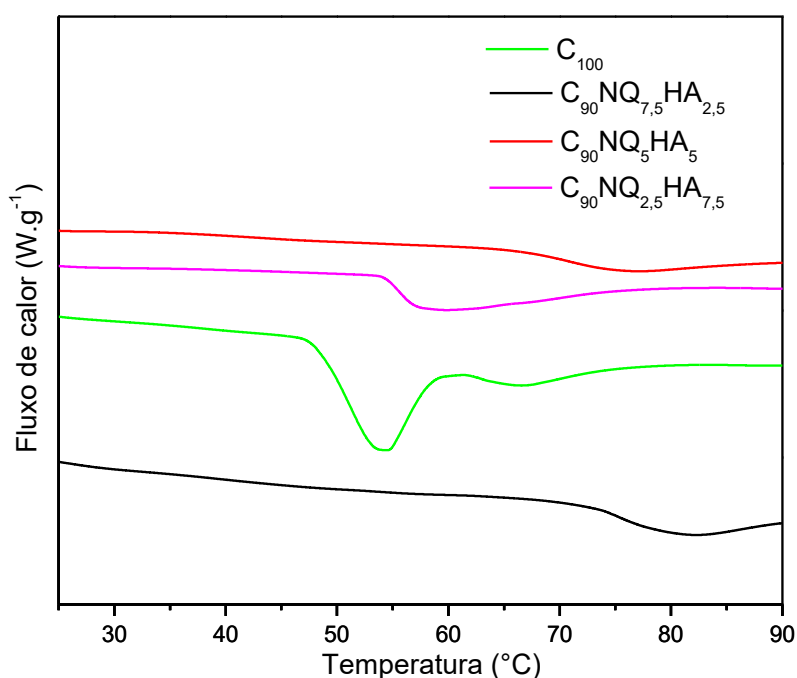
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6.4 DSC

Na figura 30 constam as curvas de DSC para os hidrogéis obtidos. Através da análise de DSC foi possível observar a mudança na temperatura inicial de desnaturação (T_d), do colágeno em função da reticulação com riboflavina e da adição dos componentes de reforço. A T_d foi determinada antes da reticulação como sendo de 40 °C, no entanto, após a reticulação, o hidrogel composto unicamente por colágeno, apresenta temperatura inicial de desnaturação por volta dos 50 °C, tal resultado pode ser considerado um forte indício da efetividade na reticulação pretendida pela riboflavina, uma vez que, o aumento das ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno faz com que seja necessário um maior grau de agitação das moléculas para

que as triplas hélices sejam desfeitas e haja desnaturação, corroborando também com os resultados obtidos da análise de FTIR. A adição de nanoqueratina apresenta-se como sendo um fator determinante na determinação da temperatura inicial de degradação. O maior teor de nanoqueratina incorporado na composição do hidrogel provocou a maior temperatura inicial de desnaturação, que ficou por volta dos 80 °C, com a redução do teor de nanoqueratina incorporado, houve a diminuição da temperatura de desnaturação. Isto se deve, principalmente à estabilidade térmica acentuada da nanoqueratina, resultado da presença de ligações dissulfeto em sua estrutura, uma vez que a nanoqueratina foi incorporada na matriz polimérica de colágeno, produzindo uma melhoria das propriedades térmicas do material.

Figura 30 – Curvas de DSC dos hidrogéis obtidos por reticulação com riboflavina/UV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O aumento no valor da temperatura inicial de desnaturação é reportado como sendo indicativo de diminuição da taxa de degradação in vivo, o que pode ser uma característica interessante para aplicações em que o biomaterial deve permanecer por mais tempo no sistema biológico. A taxa de degradação ideal é considerada como sendo a mesma taxa com a qual o tecido se regenera, ou seja, ao final da regeneração tecidual o hidrogel deve estar completamente degradado, por isso, este parâmetro é bastante variável e depende, entre outros fatores, da capacidade regenerativa do tecido no material utilizado (LANCELOTTI, 2014).

Logo abaixo encontra-se a tabela 13, onde estão expostos os valores de temperatura inicial de desnaturação para os hidrogéis estudados.

Tabela 13 - Temperatura de desnaturação dos hidrogéis

Hidrogel	Temperatura de desnaturação (°C)
C ₁₀₀	50,5
C ₉₀ NQ _{7,5} HAP _{2,5}	77,3
C ₉₀ NQ ₅ HAP ₅	70,7
C ₉₀ NQ _{2,5} HAP _{7,5}	55,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Foi possível obter uma suspensão estável de nanopartículas de queratina a partir das penas de frango por meio de metodologia simples e passível de ser utilizada. Foi possível obter colágeno a partir das peles e tendões de pés de frango com pureza, estrutura e morfologia adequadas a utilização no preparo de hidrogéis, utilizando-se metodologia viável de ser aplicada.

Foi possível obter bioapatita pura a partir do resíduo ósseo de frangos, com características similares a apatita biológica que compõe o osso humano, podendo-se destacar, o teor similar de carbonato presente, relação Ca/P característica de apatitas cálcio deficientes, e pureza, que garante a inexistência de constituintes orgânicos capazes de gerar resposta imunológica indesejável. Tendo sido obtida através de metodologia simples e passível de ser aplicada em maior escala, desta forma, suscitando uma nova rota tecnológica para agregação de valor aos subprodutos da indústria avícola. Todos os biomateriais obtidos apresentaram propriedades adequadas a formulação de biocompósitos para cultura de tecidos.

Foi possível obter hidrogéis compósitos a partir dos biomateriais extraídos de subprodutos da indústria avícola através da reticulação em todas as composições propostas, assim como avaliar a influência da variação de porcentagem dos constituintes na porosidade e estabilidade térmica dos compósitos. Ambos os componentes adicionados para melhoria nas propriedades do hidrogel promoveram diminuição progressiva de porosidade com o aumento de suas concentrações. A adição de nanoqueratina promoveu melhoria significativa na resistência térmica dos compósitos, tornando a temperatura inicial de degradação de todos os hidrogéis adequada às aplicações biomédicas e tendo alcançado o valor máximo com a composição em que há o maior percentual de nanoqueratina.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIAMAL. **Relatório anual 2016**. São Paulo, SP, 2016. Disponível em: <http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2016.
- AHEARNE, M.; COYLE, A. Application of UVA-riboflavin crosslinking to enhance the mechanical properties of extracellular matrix derived hydrogels. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Dublin, v. 54, p. 259–267, 2016.
- AHEARNE, M. *et al.* Non-destructive mechanical characterisation of UVA/riboflavin crosslinked collagen hydrogels. **British Journal of Ophthalmology**, Dublin, v. 92, n. 2, p. 268–271, 2008.
- AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, Songkhla, v. 120, p. 817-824, 2010.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, Gizé, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.
- ALIBARDI, L. *et al.* Scale keratin in lizard epidermis reveals amino acid regions homologous with avian and mammalian epidermal proteins. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, Bolonha, v. 288, n. 7, p. 734-752, 2006.
- ALVES, S. G. T.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango. **ALAN**, Caracas, v. 52, n. 3, p. 289-293, 2002
- AMBROSIO, L.; NETTI, P. A. Biomimetic hydrogels for tissue reconstruction. In: **11th International Ceramic Congress, 4th Forum on New Materials**, Sicília, CIMTEC. 2006. p. 4-9.
- APARICIO, C.; GINEBRA, M. P. Biomineralization and biomaterials: fundamentals and applications. **Woodhead Publishing**, Cambridge, 2015.
- GANESH, I. R.; GANESH, K. N. Enhanced Triple Helix Stability of Collagen Peptides with 4R-Aminopropyl (Amp) Residues: Relative Roles of Electrostatic and Hydrogen Bonding Effects. **J Am Chem Soc**, Pune, V. 123 (9), pp 2079–2080, 2001.
- BEAR, R. S.; RUGO, H. J. The results of x-ray diffraction studies on keratin fibers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 53, n. 3, p. 627-648, 1951.
- BURJANADZE, T. Evidence for the role of 4-hydroxyproline localized in the third position of the triplet (Gly-X-Y) in adaptational changes of thermostability of a collagen molecule and collagen fibrils. **Biopolymers**, Tbilisi, v. 21, n. 8, p. 1489-1501, 1982.

CHENG, F. Y. *et al.* Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food chemistry**, Chiayi, v. 113, n. 2, p. 563-567, 2009.

CHU, P. K.; LIU, X. (Ed.). **Biomaterials fabrication and processing handbook**. Flórida, CRC press, 2008.

COSTA JÚNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.6, p. 1460-1466, 2008.

CROUNSE, R. G. Keratin and Keratinization: An Essay in Molecular Biology. **Archives of Dermatology**, Whitefish, v. 87, n. 2, p. 283, 1963.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, Michigan, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, 2003.

EL BOUSHY, A. R.; VAN DER POEL, A. F. B.; WALRAVEN, O. E. D. Feather meal—A biological waste: Its processing and utilization as a feedstuff for poultry. **Biological Wastes**, Wageningen, v. 32, n. 1, p. 39-74, 1990.

ELLIOTT, J.C.; M.J. Kohn, J.; RAKOVAN, V.J.M. Hughes (Eds.), Phosphates: Geochemical, Geobiological and Material Importance, **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, vol. 48, Mineralogical Society of America, Washington, DC, 2002, pp. 427–454.

EL-SHERBINY, I.; YACOUB, M. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global cardiology science & practice**, Giza, v. 2013, n. 3, p. 316–42, 2013.

FIGUEIREDO, M. M.; MARTINS, A. G.; GAMELAS, J. A. F. Characterization of bone and bone-based graft materials using FTIR spectroscopy. **INTECH Open Access Publisher**, Coimbra, pp. 315–338, 2012.

FRASER, R. D. B.; MACRAE, T. P.; ROGERS, G. E. **Keratins: their composition, structure, and biosynthesis**. Chicago, Charles C. Thomas, 1972.

FRATZL, P. **Collagen: Structure and Mechanics**. Potsdam: Springer, 2008. p. 15–16.

GIRALDO-BETANCUR, A. L. *et al.* Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite. **Current Applied Physics**, Querétaro, v. 13, n. 7, p. 1383-1390, 2013.

GIROUD, A.; LEBLOND, C. P. The keratinization of epidermis and its derivatives, especially the hair, as shown by X-ray diffraction and histochemical studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 53, n. 3, p. 613-626, 1951.

HABEEB, A. F. S. A.; HIRAMOTO, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Memphis, v. 126, n. 1, p. 16–26, 1968.

HABERMEHL, J. *et al.* Preparation of Ready-to-use, Stockable and Reconstituted Collagen. **Macromolecular Bioscience**, Québec City, v. 5, n. 9, p. 821–828, 2005.

HEO, J. *et al.* Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. **Drug delivery and translational research**, Seoul, v. 6, n. 2, p. 148-158, 2015.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, Seattle, v. 64, p. 18-23, 2012.

HUANG, Y. -R. *et al.* Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids**, Penghu, v. 25, n.6, p. 1507-1513, 2011

IAFISCO, M. *et al.* Electrospun Nanostructured Fibers of Collagen-Biomimetic Apatite on Titanium Alloy. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, Bologna, v. 2012, p. 1–8, 2012.

IBUKI, F. K. Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário. 2014. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2014.

JEEVITHAN, E. *et al.* Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagenisolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. **Process Biochemistry**, Shanghai, v. 49, p. 1767–1777, 2014.

JOSCHEK, S. *et al.* Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. **Biomaterials**, Darmstadt, v. 21, n. 16, p. 1645–1658, 2000.

KITTIPHATTANABAWON, P. *et al.* Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). **LWT – Food Science Technology**, Songkhla, v. 43, p. 792–800, 2010.

KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, Michigan, v. 38, p. 181–364, 1986.

KUCHARZ, E. J. Biosynthesis of Collagen. In: **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 31–53. 1992.

KUO, K.C. *et al.* Bioengineering vascularized tissue constructs using an injectable cell-laden enzymatically crosslinked collagen hydrogel derived from dermal extracellular matrix, **Acta Biomater**, Hsinchu, v. 27, p. 151-166, 2015.

LANCELOTTI, C. Preparação e caracterização de hidrogéis neutros de colágeno aniônico:gelatina:extrato de semente de uva. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2014.

LODISH, H; *et al.* **Molecular cell biology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2000.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. L. *et al.* Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. **International journal of environment and pollution**, Querétaro, v. 23, n. 2, p. 162-178, 2005.

MCCALL, A. S. *et al.* Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA). **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, New York, v. 51, n. 1, p. 129, 2010.

MCCOY, M. G.; *et al.* Collagen I hydrogel microstructure and composition conjointly regulate vascular network formation. **Acta biomaterialia**, New York, v. 44, p. 200-208, 2016.

MERRY, J. C.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, v. 9, n. 12, p. 779-783, 1998.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C.P.; HAMID, N.S.A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, Malaysia, 315, 47–56, 2008.

MURUGAN, R.; RAO, K. P.; KUMAR, T.S.S. Heat-deproteinated xenogeneic bone from slaughterhouse waste: physico-chemical properties. **Bulletin of Materials Science**, Chennai, v. 26, n. 5, p. 523-528, 2003.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S.; RAO, K. P. Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone. **Materials Letters**, Chennai, v. 60, n. 23, p. 2844-2847, 2006.

NAKATA, R., OSUMI, Y., MIYAGAWA, S., TACHIBANA, A., & TANABE, T. Preparation of keratin and chemically modified keratin hydrogels and their evaluation as cell substrate with drug releasing ability. **Journal of bioscience and bioengineering**, Osaka, v. 120, n. 1, p. 111-116, 2015.

OLDE DAMINK, L. H. H.; DIJKSTRA, P. J.; VAN LUYN, M. J. A.; VAN WACHEM, P. B.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Enschede, v. 6, n. 8, p. 460–472, 1995.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 239-252, 2008

PADILHA, A. C. M.; SILVA, T. N.; SAMPAIO, A. Desafios de adequação a questão ambiental no abate de frangos: O caso da Perdigão Agroindustrial – Unidade Industrial de Serafim Corrêa – RS. **Teoria e Evidência Econômica**, Passo Fundo, p. 109-125, 2006.

PASTERIS, J. D.; WOPENKA, B.; FREEMAN, J. J.; ROGERS, K.; VALSAMI-JONES, E.; VAN DER HOUWEN, J. A.; SILVA, M. J. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a

function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. **Biomaterials**, St. Louis, v. 25, n. 2, p. 229-238, 2004.

PASTERIS, J. D.; WOPENKA, B.; VALSAMI-JONES, E. Bone and tooth mineralization: Why apatite? **Elements**, St. Louis, v. 4, n. 2, p. 97-104, 2008.

PEPPAS, N. A.; HILT, J. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; & LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. **Advanced Materials**, Austin, v. 18, n. 11, p. 1345-1360, 2006.

PIETRUCHA, K. Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Łódź, v. 36, n. 5, p. 299–304, 28 set. 2005.

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

RUNHO, R. C.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; LOPES, P. S.; POZZA, P. C. Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 187-196, 2001.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E.; JAMSHIDI, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta biomaterialia**, Tehran, v. 9, n. 8, p. 7591-7621, 2013.

SARAVANAN, S.; SAMEERA, D. K.; MOORTHY, A.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan scaffolds containing chicken feather keratin nanoparticles for bone tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, Tamil Nadu, v. 62, p. 481-486, 2013.

SENARATNE, L. S.; PARK, P. -J.; KIM, S. -K. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, Busan, v. 97, p. 191–197, 2006.

SILVA, Mariana Inês do Nascimento. **Preparo e estudo físico-químico e morfológico de hidrogel de alginato recoberto com quitosana contendo berberina**. 2015. Monografia (graduação) — Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Curso de Farmácia, 2015. Disponível em: < <http://bdm.unb.br/handle/10483/10963> >. Acesso em: 1 dez. 2016.

SINHORINI, M. R. **Processo de produção de farinha de penas hidrolisadas: estudos de otimização do teor protéico e do valor de digestibilidade da proteína**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SIONKOWSKA, A.; KOZŁOWSKA, J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. **International Journal of Biological Macromolecules**, Torun, v. 47, n. 4, p. 483-487, 2010

SQUIRE, J.; VIBERT P.J.; ELLIOTT, A. **Fibrous protein structure**. San Diego, US: Academic Press; 1987.

ŠUPOVÁ, M.; MARTYNKOVÁ, G. SIMHA; SUCHARDA, Zbyněk. Bioapatite made from chicken femur bone. **Ceramics–Silikáty**, Prague, v. 55, n. 3, p. 256-260, 2011.

ŠUPOVÁ, M. Isolation and preparation of nanoscale bioapatites from natural sources: a review. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, Prague, v. 14, n. 1, p. 546-563, 2014.

TAMILMOZHI, S.; VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). **Food Research International**, Tamil Nadu, v. 54, n. 2, p. 1499-1505, 2013.

TIAN, Z.; LIU, W.; LI, G. The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde. **Polymer Degradation and Stability**, Chengdu, v. 130, p. 264–270, 2016.

TIRELLA, A.; LIBERTO, T.; AHLUWALIA, A. Riboflavin and collagen: New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels. **Materials Letters**, Pisa, v. 74, p. 58–61, 2012.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, Parangipettai, v. 48, p. 1592–1602, 2013.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; AJITHKUMAR, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, Parangipettai, v. 43, p. 708-716, 2015

WANG, B.; YANG, W.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, San Diego, v. 76, p. 229-318, 2016.

WORTMANN, F.-J.; AUGUSTIN, P.; POPESCU, C. Temperature dependence of the water-sorption isotherms of wool. **Journal of Applied Polymer Science**, Aachen, v. 79, n. 6, p. 1054–1061, 2001.

XU, Y.; BHATE, M.; BRODSKY, B. Characterization of the nucleation step and folding of a collagen triple-helix peptide. **Biochemistry**, New Jersey, v. 41, n. 25, p. 8143–51, 2002.

YU, P.; MCKINNON, J. J.; CHRISTENSEN, C. R.; CHRISTENSEN, D. A. Using synchrotron-based FTIR microspectroscopy to reveal chemical features of feather protein secondary structure: comparison with other feed protein sources. **Journal of agricultural and food chemistry**, Saskatoon, v. 52, n. 24, p. 7353-7361, 2004.

ZENG, S.-K.; ZHANG, C.-H.; LIN, H.; YANG, P.; HONG, P.-Z.; JIANG, Z. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, Guangdong, v. 116, p. 879–883, 2009.