



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**



KARYANE MEAZZA

**AVALIAÇÃO DO BENEFICIAMENTO DE RESÍDUOS DO PIRARUCU PARA
A PRODUÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A BASE DE HIDROXIAPATITA E
FIBRA DE COLÁGENO**

MANAUS, AM

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**



KARYANE MEAZZA

**AVALIAÇÃO DO BENEFICIAMENTO DE RESÍDUOS DO PIRARUCU PARA
A PRODUÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A BASE DE HIDROXIAPATITA E
FIBRA DE COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Silva Andrade

MANAUS, AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

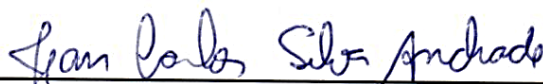
Meazza, Karyane
M484a Avaliação do beneficiamento de resíduos do pirarucu para a
 produção de biocompósitos a base de hidroxiapatita e fibra de
 colágeno / Karyane Meazza. 2019
 63 f.: il.; 31 cm.

 Orientador: Jean Carlos Silva Andrade
 Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -
 Universidade Federal do Amazonas.

 1. Biocompósitos. 2. Hidroxiapatita. 3. Fibra de Colágeno. 4.
 Beneficiamento de resíduos do Pirarucu. I. Andrade, Jean Carlos Silva
 II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Ata de Defesa Pública da Dissertação de Mestrado da aluna **KARYANE MEAZZA**, do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, realizada no dia 07 de março de 2019.

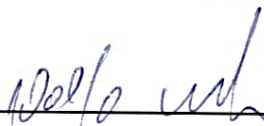
Às 14:00h do dia 07 de março de 2019 na Sala Multiuso 2 – Bloco Administrativo da Faculdade de Tecnologia no Campus Universitário da UFAM, foi realizada a Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da discente **KARYANE MEAZZA**, intitulada “*Avaliação do beneficiamento de resíduos do pirarucu para a produção de biocompósitos a base de hidroxiapatita e fibra de colágeno*”, como parte final de seu trabalho para a obtenção de grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. A Banca Examinadora constitui-se dos seguintes professores: Prof. Dr. Jean Carlos Silva Andrade (Orientador e Presidente – PPGCEM), Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches (UFAM) e Prof. Dr. Adolfo José da Mota (UFAM). Após a apresentação do trabalho, os examinadores fizeram as observações concernentes. Todas as sugestões da Banca Examinadora serão consideradas pela aluna ao preparar a versão final de seu trabalho escrito. Em seguida, a Banca Examinadora reuniu-se e concedeu o conceito APPROVADA (aprovada/não-aprovada). Coordenação da Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, em Manaus, 07 de março de 2019.



Prof. Dr. Jean Carlos Silva Andrade (Orientador e Presidente)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM)



Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Prof. Dr. Adolfo José da Mota
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dedico esta dissertação a minha família, que
são a minha base de amor e incentivo incessante em
todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por iluminar o meu caminho até a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Ary e Jacira, que me guiaram e se esforçaram muito para a minha educação, mostrando o verdadeiro significado do amor e da honestidade.

As minhas irmãs, a Viviane que sempre acreditou em mim, com sua alegria que sempre me contagia, e a Aryane que me ensinou o poder da força de vontade e por sua serenidade que me inspira.

Ao meu cunhado Leonardo, que me acolheu em sua casa com zelo e carinho de um irmão.

Aos meus adoráveis e magníficos sobrinhos, Davi e Levi, por todos os momentos de diversão e pela capacidade em “derreter” o coração da tia com um simples sorriso.

Ao meu orientador, Dr. Jean Carlos de Andrade por me aceitar em seu grupo de pesquisa e confiar no meu trabalho.

Aos professores, Dr. Sérgio Michielon, Dr. Edgar Sanches, Dr. Marcos Marques, Dr. Yurimiller Leyet, Dr. Pedro Campelo e Dr. José Costa, do PPGCEM, que ministram as disciplinas cursadas ao decorrer do programa com maestria e compromisso com o aprendizado.

Ao LABMAT e sua equipe, pelas análises de DRX e principalmente ao técnico e agora Msc. Miécio Melquiades, que sempre foram receptivos a conversas e troca de ideias sobre análises e parâmetros, bem como motivação em momentos difíceis.

Ao laboratório LAMAC e a sua equipe, por abrir as portas para a realização de algumas atividades e análises deste trabalho.

Ao laboratório de Tecnologia do Pescado e a sua equipe, principalmente a Mestranda Klaramélia, a graduanda Paula e ao Técnico Fábio, pela receptividade e parceria nos dias de trabalho durante a extração do colágeno.

Ao laboratório de Purificação de Biomoléculas da UFAM, pelo uso da centrífuga e análise do teor de proteínas, principalmente ao Técnico Júlio Nino.

Ao Prof. Dr. Adolfo Mota, do laboratório de Biotecnologia, pela receptividade disponibilizada em contribuir com a liofilização das amostras.

Aos amigos, Msc. Fátima Geisa, Msc. Madalena da Rocha Pietzsch e Matheus da Rocha Pietzsch pelo incentivo inicial em desempenhar mais este projeto.

Aos amigos feitos ao decorrer do programa, a graduanda Ana Alice Barros, o graduando Mateus Oliveira, ao Mestrando Eric Kido e a Mestranda Laura Bentes, pelo apoio, parceria e paciência em sentir as “fragrâncias” durante a obtenção das matérias primas deste trabalho.

Por fim, a Universidade Federal do Amazonas e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pelo apoio financeiro.

RESUMO

Ao decorrer dos anos a ciência busca fornecer materiais que permitam o desenvolvimento de dispositivos para substituir ou coexistir com os tecidos do corpo humano. Dentre estes, os biocompósitos possibilitam a melhoria de propriedades químicas e mecânicas requeridas na aplicação, que deverão ser capazes de fornecer o intercrescimento com o material biológico além de resistir as cargas fornecidas no local. O beneficiamento da hidroxiapatita e do colágeno obtido de resíduos do Pirarucu, fonte natural, representam baixo custo, além da combinação fornecer as duas fases principais do osso humano. O objetivo deste estudo foi avaliar o beneficiamento dos resíduos do pirarucu, pela produção de corpos densos de hidroxiapatita (HAp), proveniente da escama de pirarucu e fibra de colágeno (FCn), proveniente da pele do pirarucu, na proporção de 15, 30 e 45% em peso de FCn em HAp. Os materiais obtidos, HAp e FCn, foram caracterizados termicamente, estruturalmente, quimicamente e morfologicamente, através de análises de DSC/TGA, DRX, FRX, FT-IR e MEV/FEG, respectivamente. Para direcionamento de aplicação como biomaterial foi realizado um teste de biodegradabilidade e o ensaio mecânico, para determinação da dureza de Vickers. Como resultado da análise térmica realizada na escama e na pele do pirarucu, foi observado que a perda de massa tende a estabilizar em 550 e 700°C respectivamente, com percentuais de perda de 52 e 90%. Após o beneficiamento da escama foi avaliado a HAp obtida que apresentou razão molar de 1,5 Ca/ P e estrutura cristalina hexagonal similar com a já relatada por outros autores, com um rendimento de 47% em massa. Para o beneficiamento da pele, foi observado que através da extração ácida é possível obter fibra de colágeno e colágeno, com teor de proteína total de 98,10 e 87,98% e rendimento de 24 e 5%, respectivamente, além de ambos apresentarem morfologia reticulada, considerando assim a fibra de colágeno uma opção para utilização na formação de biomateriais por esta apresentar um melhor rendimento. Com a formação de uma matriz composta de fibra de colágeno e hidroxiapatita, foi possível confirmar o potencial dos materiais obtidos para a produção de biomateriais, quando avaliado a biodegradabilidade que tende a estabilização da perda de massa no décimo segundo dia, além da correlação observada entre a microdureza de Vickers e concentração de fibra de colágeno, que apresentou os valores de 0,42, 0,38, e 0,34, respectivamente nas concentrações 15%, 30% e 45%.

Palavras-chave: Biocompósitos; Hidroxiapatita; Fibra de Colágeno; Beneficiamento de resíduos do Pirarucu.

ABSTRACT

Over the years science has sought to provide materials that enable the development of devices to replace or coexist with the tissues of the human body. Among these, the biocomposites allow the improvement of the chemical and mechanical properties required in the application, which should be able to provide the intergrowth with the biological material besides resisting the loads supplied in the place. The beneficiation of hydroxyapatite and collagen obtained from residues of the natural source Pirarucu represent low cost, in addition to the combination provide the two main phases of human bone. The objective of this study was to evaluate the recovery of pirarucu residues by the production of dense bodies of hydroxyapatite (HAp), derived from pirarucu and collagen fiber (FCn), from pirarucu skin, in the proportion of 15, 30 and 45 wt% FCn in HAp. The obtained materials, HAp and FCn, were characterized thermally, structurally, chemically and morphologically, by DSC / TGA, DRX, FRX, FT-IR and MEV / FEG respectively. A biodegradability test and the mechanical test were used to determine the hardness of Vickers. As a result of the thermal analysis performed on the skin and the skin of the pirarucu, it was observed that the loss of mass tends to stabilize at 550 and 700 ° C respectively, with loss percentages of 52 and 90%. After the treatment of the scale, the HAp obtained was obtained, which presented a 1.5 Ca / P molar ratio and similar hexagonal crystalline structure with that reported by other authors, with a yield of 47% in mass. For the treatment of the skin, it was possible to obtain collagen fiber and collagen, with a total protein content of 98.10 and 87.98% and a yield of 24 and 5%, respectively. crosslinked morphology, thus considering collagen fiber an option for use in the formation of biomaterials because it presents a better yield. With the formation of a matrix composed of collagen fiber and hydroxyapatite, it was possible to confirm the potential of the materials obtained for the production of biomaterials, when evaluated the biodegradability that tends to stabilize the mass loss on the twelfth day, besides the observed correlation between Vickers microhardness and collagen fiber concentration, which presented values of 0.42, 0.38, and 0.34, respectively at the concentrations of 15%, 30% and 45%.

Keywords: Biocomposites; Hydroxyapatite; Collagen Fiber; Pirarucu waste recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pirarucu	16
Figura 2: Escama do Pirarucu.....	18
Figura 3: Couro do Pirarucu tingido para venda.....	18
Figura 4: Comportamento biológico dos biomateriais.....	21
Figura 5: Rede Cristalina da Hidroxiapatita.....	23
Figura 6: Manta do Pirarucu após o filamento da carne.....	29
Figura 7: Amostras de Escama de Pirarucu para análise de DRX.....	30
Figura 8: Fluxograma da Limpeza da escama.....	31
Figura 9: Fluxograma do Tratamento Térmica-Alcalino.....	32
Figura 10: Pele do Pirarucu sem escamas.....	33
Figura 11: Fluxograma da Extração ácida do Colágeno.....	34
Figura 12: Pele durante extração ácida.....	35
Figura 13: Análise Termogravimétrica da Escama do Pirarucu.....	39
Figura 14: Difração de Raio-X da Escama do Pirarucu “in- natura”.....	40
Figura 15: Difração de Raio-X da escama calcinada a 700°C e a 1000°C, com ICSD 56307.....	41
Figura 16: Espectro de FT-IR da escama do Pirarucu.....	43
Figura 17: Mapa FEG da HAp natural a 1000°C.....	43
Figura 18: Micrografias de partículas de HAp Natural a 1000°C: (a) 5000X, (b) 10000X e (c) 20000X.....	44
Figura 19: Distribuição média das partículas de HAp (1000°C).....	45
Figura 20: Análise Termogravimétrica da Pele do Pirarucu.....	46
Figura 21: Difração de Raio X do Colágeno Natural (Cn) e da Fibra de Colágeno (FCn).....	47
Figura 22: Materiais obtidos após a liofilização: (a) Colágeno em pó e (b) Fibra de Colágeno.....	48
Figura 23: IR- FT Colágeno Natural (Cn) e Fibra de Colágeno (FCn).....	49
Figura 24: Mapa FEG- Colágeno Natural (Cn) e da Fibra de Colágeno (FCn).....	49
Figura 25: Micrografias-MEV do Colágeno Natural (Cn): (a) 10000X, (b) 20000X e (c) 40000X.....	50
Figura 26: Micrografias da Fibra do Colágeno (FCn): (a) 1000X, (b) 5000X e (c) 20000X.....	51
Figura 27: Curva de biodegradação do compósito formado de HAp em FCn.....	53
Figura 28: Gráfico de Dureza Vickers do Biocompósito em diferentes concentrações....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações clínicas dos biomateriais	20
Tabela 2: Propriedades mecânicas do tecido rígido e das cerâmicas.....	22
Tabela 3: Tipos de colágeno.....	26
Tabela 4: Proporções da formação do compósito.....	36
Tabela 5: Quantificação dos elementos presentes na escama.....	42
Tabela 6: Características dos poros do Cn e FCn.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O PIRARUCU (<i>Arapáima Gigas</i>)	16
3.2 BIOMATERIAIS	19
3.2.1 Biocerâmicas	21
3.2.2 Biopolímeros	24
3.2.3 Biocompósitos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	29
4.2 BENEFICIAMENTOS DAS ESCAMAS	29
4.2.1 Caracterização preliminar das escamas	29
4.2.2 Limpeza das escamas	30
4.2.3 Extração da Hidroxiapatita (HAp)	31
4.2.4 Caracterização da HAp	32
4.3 BENEFICIAMENTO DA PELE	33
4.3.1 Limpeza e conservação da pele	33
4.3.2 Caracterização preliminar da pele do pirarucu	33
4.3.3 Extração do Colágeno	34
4.3.3 Caracterização do colágeno	35
4.4 OBTENÇÃO DO BIOCOMPÓSITO	36
4.4.1 Teste de biodegradabilidade	37
4.4.2 Ensaio Mecânico	37
i) Microdureza	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Beneficiamento da escama	39
i) Análise Térmica	39
ii) Difração de Raio-X	40
iii) Análise de Fluorescência de Raio-X	41
iv) Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	42
v) MEV-FEG ZEIS	43
vi) Análise da distribuição das partículas	45
5.2 Beneficiamento da Pele	46
i) Análise Térmica da Pele do Pirarucu	46

ii) Difração de Raio X.....	47
iii) Teor de Proteínas.....	47
iv) Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FCn- Cn)....	48
v) Microscopia Eletrônica de Varredura- FEG Zeiss.....	49
vi) Análise e Metodologia BET	52
5.3 Obtenção do Biocompósito (HAp- FCn)	52
i) Biodegradabilidade.....	52
ii) Microdureza de Vickers	53
6. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países que abriga a maior biodiversidade do planeta, devido à variedade de biomas que refletem a enorme riqueza da flora e da fauna brasileira. Esta abundante variedade, se traduz em mais de 20% do número total entre espécies da Terra e eleva o país ao posto de principal da nação entre os 17 países de maior biodiversidade. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, apesar de toda esta riqueza em forma de conhecimento de espécies nativas, a maior parte das atividades econômicas nacionais se baseiam em espécies exóticas, como a agricultura, entretanto a biodiversidade pode se tornar uma grande vantagem na busca pelo desenvolvimento nacional, se explorado de maneira adequada [1].

Uma das maneiras de extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam ter valor econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto [2]. Neste âmbito, atualmente são encontrados alguns estudos científicos sobre a produção de biomateriais a partir da bioprospecção. Por exemplo, a extração de fosfatos de cálcio das escamas e crustáceos, além do aproveitamento de colágeno de frutas e da pele dos animais.

Um biocompósito que já existe comercialmente é o *Bio-oss collagen*, da marca *Geisthish*, é a base de fosfatos de cálcio e colágeno, sendo aplicados para tratamento de traumas ósseos, onde se tem uma resposta mais rápida do organismo. Estes são obtidos naturalmente, como matéria prima de fonte suína, no entanto, esta é passível de certas doenças transmissíveis, que se o rejeito não for bem tratado e inspecionado pode oferecer riscos. Este fator justifica o estudo de outras fontes naturais que não ofereçam tais riscos, como por exemplo, os resíduos pesqueiros, que se apresenta como uma alternativa não tóxica e de fácil controle microbiano.

A crescente busca por estes materiais, se deve ao fato histórico do aumento da expectativa de vida da população, no qual ao invés de processos agudos que envolvem a cura ou óbito, se torna predominantes em idosos, doenças crônico-degenerativas e suas complicações. De acordo com Levingstone (2016), um dos desafios clínicos ainda existentes é o tratamento de defeitos e traumas ósseos, em particular se o fornecimento vascular ao tecido estiver danificado. As estratégias da engenharia de tecidos da próxima geração não são apenas concebidas para imitar o tecido extracelular nativo, mas também para induzir as células a proliferar, diferenciar e, em última instância, recapitular o processo de reparo natural [4].

Antes é relevante mencionar que o osso humano é composto por duas fases principais, a orgânica e inorgânica. A fase orgânica é composta principalmente de colágeno e a inorgânica de fosfatos de cálcio e outros minerais. Quanto maior a similaridade química do material com o osso humano, maior será a probabilidade de sucesso na implantação. Muitos pesquisadores correlacionam a osteointegração rápida dos implantes revestidos com apatita à capacidade de revestimentos de fosfato de cálcio para adsorver proteínas. Estudos realizados em décadas recentes, a partir de modificações químicas da superfície pela incorporação de íons de cálcio (Ca) e fósforo (P), no implante através de vários métodos de fabricação, mostram que implantes revestidos por hidroxiapatita, apresentam graus mais elevados de osteocondutividade, atingindo graus mais altos de fixação quando comparado a outros bioativos comercialmente disponíveis [5].

Além da hidroxiapatita, proteínas como o colágeno, elastina, fibrina e albumina podem oferecer uma vantagem adicional quando utilizadas como matéria- -prima de um biomaterial, uma vez que podem ser capazes de interagir favoravelmente com as células através de domínios específicos de reconhecimento presentes na estrutura celular [6]. Como consequência, compósitos que imitam a composição de hidroxiapatita e colágeno do osso, já apresentaram excelentes resultados em modelos animais e atualmente vem sendo usado em pacientes humanos [7,4].

Como proposta, esta pesquisa visou avaliar a possibilidade de beneficiamento dos resíduos do Pirarucu para a extração de fibra de colágeno e hidroxiapatita, através da avaliação do rendimento e qualidade dos compostos obtidos, para o estudo de novos biomateriais, e em específico a formação de um biocompósito com fibra de colágeno e hidroxiapatita. Para isso é importante relatar que não foi encontrado outros estudos com esta finalidade utilizando o resíduo do Pirarucu, no entanto, este pode ser uma fonte promissora visto que cerca de 38% em peso do pirarucu recebe outras destinações após o filamento. De acordo com Meyers (2012), a escama pode também ser uma alternativa como material para aplicação aeroespacial, devido ao potencial em propriedades mecânicas.

De modo a cumprir esta proposta a dissertação pode ser dividida em quatro macro etapas: na primeira os resíduos recebem um pré tratamento para a obtenção e conservação da matéria prima; na segunda é realizado o beneficiamento da escama para obtenção da hidroxiapatita e caracterização desta; na terceira é realizado o beneficiamento a pele para obtenção da fibra de colágeno e caracterização desta; e na quarta onde ambos materiais são testados através da formação do biocompósito em diferentes concentrações, para teste de biodegradabilidade e ensaio mecânico, conforme descrito nos objetivos.

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa objetivou o desenvolvimento de metodologia para avaliar o beneficiamento do Pirarucu para o desenvolvimento de um biocompósito a base de hidroxiapatita e fibra de colágeno, a partir do tratamento térmico alcalino e da extração ácida a frio, respectivamente. Para isso estão explicitados os objetivos específicos abaixo: Extrair e caracterizar a hidroxiapatita obtida pelo tratamento térmico-alcalino da escama do Pirarucu;

i) Extrair a hidroxiapatita obtida da escama do Pirarucu pelo tratamento térmico alcalino, com uma caracterização preliminar da escama, que visou conhecer o comportamento térmico do resíduo e ter este como base para definição da temperatura de calcinação que foi utilizada no tratamento. Em seguida, a hidroxiapatita obtida foi avaliada pelas técnicas: químicas pela técnica de Fluorescência de Raio X e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, estrutural através da técnica de Difração de Raio X, e morfológica através da microscopia eletrônica por varredura com emissão de campo que permite a obtenção de imagens da morfologia como também o mapeamento e distribuição dos elementos do composto, por fim foi utilizado a técnica de difração a laser a fim de verificar a distribuição no tamanho das partículas.

ii) Extrair fibra de colágeno pela extração ácida a frio, com uma caracterização preliminar da pele do pirarucu quanto ao seu comportamento térmico, onde o objetivo foi avaliar a desnaturação das proteínas com o aquecimento da amostra. Em seguida, o colágeno e a fibra de colágeno foram caracterizados quanto ao teor de proteína total e rendimento, obtido da pele do Pirarucu, além as amostras foram submetidas para análise da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, estrutural através da técnica de Difração de Raio X, a morfologia também foi determinada através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo e este composto foi determinado a área superficial (BET).

iii) Avaliar o desenvolvimento do biocompósito nas proporções: 15, 30 e 45% formado através da prensagem uniaxial a frio e caracteriza-lo em relação a sua estabilidade química em solução salina, através do teste de biodegradabilidade. Em seguida, medir a Microdureza de Vickers como propriedade mecânica para possíveis aplicações.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O PIRARUCU (*Arapáima Gigas*)

O pirarucu, representado na figura 1, é a principal espécie de pescado da Amazônia e é considerado importante para a piscicultura no Brasil, tanto na produção de alimentos, quanto na proteção, com repovoamento de estoques naturais, onde encontra na bacia Amazônica, seu habitat predileto e pode ser racionalmente criado nas regiões Nordeste, Centro Oeste e em áreas restritas do Sudeste, onde não ocorra variações bruscas de temperatura [9].



Figura 1: Pirarucu

Fonte: www.guidaallapesca.it, com acesso em janeiro de 2018.

Com o nome científico “*Arapáima Gigas*” (*arapáima*, do vernacular e o específico *gigas*, de gigante), este pode chegar a três metros de comprimento, com cerca de duzentos quilogramas, quando adulto. Sua carne possui uma coloração rosada e desprovida de espinhas, que inspirou o nome “*Pirarucu*”, que significa em sua origem indígena, “*pira*=peixe” e “*urucu*=vermelho”, cor característica da semente da planta urucu (*Bixa orellana*, da qual se extrai o coral) e é bem valorizada na região amazônica e em mercados externos é comercializada muitas vezes na forma de filé congelado ou bacalhau, com preços mais atrativos [11].

Seus representantes têm língua óssea e espinhosa, bastante áspera ao tato; corpo cilíndrico na porção anterior e ligeiramente comprimido na porção posterior; escamas grandes e imbricadas, em forma de mosaico; nadadeiras dorsal e anal muito alongadas, contornando grande parte da porção posterior do corpo e quase se unindo à nadadeira caudal, que é curta. Até recentemente, os peixes desta família eram incluídos na família Osteoglossidae [12].

O pirarucu é um peixe carnívoro, que consome peixes e ocasionalmente camarões, caranguejos e insetos; é territorialista, tem preferência por lagos e não realiza migrações consideráveis; a respiração aérea obrigatória permite-lhe ficar vivo fora da água por mais de 24 horas, desde que seu corpo seja mantido úmido; a tomada de ar atmosférico é vital e os adultos não toleram permanecer submersos, sem vir à tona, por mais de 40 minutos. A necessidade de repetidas subidas à superfície constitui grande ameaça para o pirarucu, tanto para adultos, que são alvo da pesca, quanto para os jovens que se tornam presas fáceis para predadores, principalmente aves. [13].

Segundo a estatística de pesca extrativa das principais espécies de água doce, o preço médio comercial do pirarucu varia de sete a oito reais por quilograma, este valor é alto quando comparado as demais espécies, sendo assim considerada uma das carnes mais nobres da região norte [14].

O pirarucu vem sendo considerado, por muitos e há algum tempo, como vulnerável, fato decorrente do intenso esforço de pesca que vem sendo aplicado sobre esta espécie desde o início da colonização na Amazônia. Apesar das medidas legais tomadas para sua proteção, a espécie continua sendo explorada indiscriminadamente, pois é encontrada nos principais mercados e feiras durante todos os períodos do ano. Devido, sobretudo, à baixa densidade dos estoques e às medidas controladoras de sua captura, o pirarucu tornou-se um tipo de pescado bastante disputado, sendo o mais caro da Amazônia. Considerando um peso médio de 50 quilos para os peixes de bom tamanho para comercialização, a um preço médio de R\$ 10,00 o quilo, deduz-se que uma exemplar renda cerca de R\$ 500,00, o que corresponde ao preço médio de um animal bovino de grande porte. Felizmente, experiências de manejo de estoques no ambiente natural, como tem ocorrido na área da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, dão um novo alento à preservação do pirarucu na Amazônia [12].

A espécie está, também, incluída no Anexo II da IN MMA nº 05/2004, que relaciona as espécies brasileiras sobre pescadas ou ameaçadas de sobre- exploração. O cultivo é, certamente, muito bem-vindo e importante para diminuir a pressão da pesca sobre os estoques naturais e para o incremento da oferta do pescado, se fundamentado em estudo que viabilize o fechamento de todo o ciclo de cultivo: ambientes (tanques) artificiais; plantel de reprodutores próprios; obtenção dos alevinos por meio desses reprodutores e em ambiente controlado; engorda em ambiente próprio e controlado, entre outros aspectos [13].

Com base nos estudos realizado por Santos et. Al em 2006, Neto e Dias em 2015, realizaram algumas considerações válidas objetivando melhorar o sistema de gestão para a recuperação dos estoques de pirarucu e a manutenção de uma exploração sustentável. Estas são:

- Desenvolvimento e implementação de um sistema eletrônico de certificação da origem de produtos do pirarucu disponíveis no mercado (da pesca e da aquicultura);
- Só autorizar a piscicultura de pirarucu que não dependa da coleta dos alevinos/jovens no ambiente natural (a produção dos alevinos deve ser de reprodutores próprios e de desova em ambiente controlado);
- Unificar os períodos de defeso (com pesca proibida) ou proibir a pesca em áreas que não adotem o manejo controlado;
- Melhorar o sistema de controle e de fiscalização do pirarucu (produtos frescos ou salgados);

Na Região Amazônica, o pirarucu é provavelmente a espécie que apresenta as melhores perspectivas para a criação em regime intensivo. Apresenta grande velocidade de crescimento, podendo alcançar 10 kg no primeiro ano de criação [15,16], rusticidade ao manuseio, respiração aérea [17] e facilidade de ser treinado para aceitar ração extrusada [18] e suporta altas densidades de estocagem [19]. A respiração aérea do pirarucu é uma característica fisiológica que facilita sua criação em tanques-rede, principalmente pela baixa demanda de oxigênio na água, o que não é comum em peixes com respiração branquial [20].

O pirarucu é comercializado na forma de manta fresca, congelada, seco-salgada e defumada. Por ser um peixe grande e pela sua crescente comercialização, o

beneficiamento do pirarucu gera muitos resíduos como, por exemplo, cabeça, vísceras, nadadeiras, escamas e couro, os quais podem ser reaproveitados como subprodutos a fim de agregar valor à produção e proporcionar novos produtos provenientes de pescado. Suas escamas, representadas na figura 2, são comumente utilizadas como lixa de unha ou na confecção de ornamentos, e sua língua, óssea e áspera, é largamente utilizada para ralar o guaraná em bastão [16].



Figura 2: Escama do Pirarucu

Fonte: goiasfly.blogspot.com.br, acesso em janeiro de 2018.

A escama do pirarucu pode ser considerada uma cerâmica flexível e extremamente dura, considerando que protege o pirarucu dos dentes da piranha que conseguem penetrar parcialmente as escamas individuais, mas se quebram antes que consigam atingir o tecido muscular por trás delas. Além da cobertura mineralizada dura na superfície, cada escama possui por baixo uma estrutura de materiais muito mais moles, essencialmente fibras de colágeno, mas que, ao se empilhar em direções alternadas, atingem quase metade da dureza da cerâmica externa. Tais características motivam pesquisas de biomimetismo para desenvolvimento de novas tecnologias, como por exemplo, criação de escudos protetores e hiper-resistentes. O potencial de aplicação das escamas do pirarucu apresenta-se desde aplicações para proteção pessoal e veicular, até mesmo para blindar espaçonaves contra o choque de micrometeoritos e lixos espaciais [8].



Figura 3: Couro do Pirarucu tingido para venda

Fonte: Taia, 2014

Assim como as escamas, a pele do pirarucu é um material resistente que combina várias camadas de tecido entrelaçadas, que suportam não só o peso do pirarucu, como também cargas mecânicas exigidas pelo meio externo e pelo contato direto com as escamas. Em 2009, o G1 publicou uma matéria que retrata o uso da pele do pirarucu artesanalmente para a produção de couro aplicado em vestimentas, bolsas, sapatos entre outros acessórios. Abordou ainda, fundamentado em pesquisas do INPA que o couro

deste peixe apresenta vantagens em relação ao bovino: sustenta mais tensão, já que suas fibras são entrelaçadas, enquanto a pele do bovino, as fibras estão dispostas em paralelo [23]. Além disso, lojas de venda online divulgam a pele do pirarucu como “couro exótico”, com tingimento em diversas cores como demonstrado na figura 3.

O material resultante do filamento do processamento de pescados é constituído por resíduos chegando até 72% após a produção de filé sem pele, estes resíduos de pescado são ricos em colágeno e caracterizam como uma ótima opção de matéria prima para a elaboração de gelatina que é obtida através da desnaturação do colágeno presente na pele e escamas do pescado [24].

3.2 BIOMATERIAIS

O conceito de biomaterial foi estabelecido em 1986, pela *European Society for Biomaterials Consensus Conference*, como “Substâncias ou combinação de substâncias (com exceção das drogas e dos fármacos) de origem animal ou sintético que podem ser usadas por um período, como parte ou como um todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo [25].

Atualmente, define-se biomateriais como materiais de substâncias naturais ou sintéticas utilizadas na substituição e/ou restauração de tecidos, órgão ou parte do corpo humano, de forma permanente ou temporária que permitem a recuperação do sistema biológico afetado por acidentes ou doenças. Esta definição foi exposta a partir de 1991, e abrange o uso de materiais vivos e não vivos [26].

Os primeiros registros de materiais utilizados para o reparo e a reconstituição de partes do corpo humano vêm desde civilização egípcia, em torno de 1.000 anos A.C., quando se usavam placas de ouro para restaurar defeitos no crânio. Desde então, outras civilizações, como os romanos, os chineses e os astecas utilizavam membros artificiais para suprirem as necessidades das partes do corpo humano danificados da época [27].

O que difere um biomaterial das demais classes é a sua capacidade em permanecer em ambientes biológicos sem ocasionar deterioração e danificação dos tecidos, exigindo desta maneira duas propriedades principais: A “biocompatibilidade”, que se refere à compatibilidade com o meio biológico, a curto e longo prazo, sem ocasionar toxicidade, alergenidade, carcinogenicidade, mutagenidade ou qualquer prejuízo ao organismo; e a “biofuncionalidade” que se refere a capacidade em desempenhar uma resposta tecidual favorável em uma aplicação específica do organismo, ou seja, resistir/ suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração (reação, fratura, abrasão) e, também, não deve alterar o meio biológico nem reagir com o sangue, ou desnaturar proteínas [28,29,30].

Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde, estimados em cerca de 300 mil há cerca de 10 anos. Dentre eles, podem ser citados como exemplos dispositivos biomédicos, materiais implantáveis, dispositivos para a liberação de medicamentos, órgãos artificiais e curativos, dentre muitos outros [31]. A tabela 1 representa algumas possibilidades de aplicações clínicas, baseadas nas classificações dos materiais de acordo com suas propriedades.

Tabela 1: Aplicações clínicas dos biomateriais.

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros			
Polietileno PTFE Poliésteres Poliuretano PMMA Silicone	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Saturas, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia. Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários.
Metais e ligas			
Aço inoxidável Liga de titânio Liga de cobalto-cromo	Alta força de tensão, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, fios, hastes); implantes dentários
Cerâmicas e vidros			
Alumina Zircônia Carbono Fosfatos de cálcio Porcelana Vidros Bioativos	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais
Compósitos			
Fibra de carbono-resina termofixa Fibra de carbono-termoplástico Carbono- Carbono Fosfato de cálcio-colágeno	Boa biocompatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Fonte: PARK, 1980; AOKI, 1988; KAWACHI et. al, 2000.

O grau de sucesso de um determinado biomaterial é um fator de difícil avaliação e o sucesso na implantação de um biomaterial, pode ser associado em alguns casos, por exemplo, à severidade do processo inflamatório desencadeado, ao nível de satisfação do paciente, ao tempo necessário para o restabelecimento das atividades básicas do paciente, ao tempo de permanência do implante no corpo, entre outros [28, 35].

De acordo com a resposta induzida ao meio biológico, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos. A resposta induzida pelos materiais bioinertes e biotoleráveis, em relação ao tecido ósseo, é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso não aderente, que impossibilita a interação direta entre implante e tecido, podendo levar à instabilidade e falha, conforme representado na figura 4 (a), pela lacuna preta, simbolizando a capsula fibrosa. Os materiais bioativos são capazes de interagir intimamente com o tecido vivo sem a intervenção de tecido fibroso, conforme representado na figura 4 (b). Uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo possibilita a formação de uma ligação química entre o material e o próprio tecido vivo, também chamada por bioadesão [36,37].

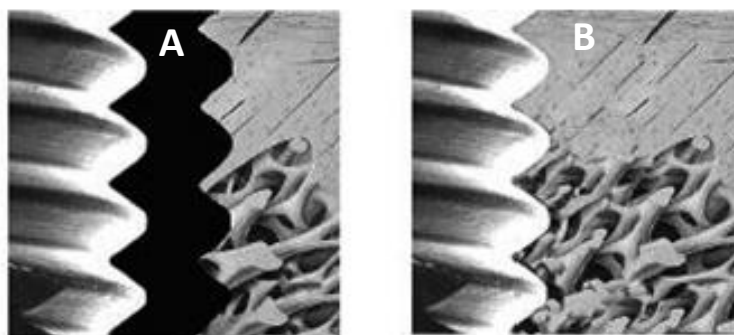


Figura 4: Comportamento biológico dos biomateriais
Fonte: GUASTALDI e APARECIDA, 2010

3.2.1 Biocerâmicas

O termo biocerâmica é um termo relativamente novo e não era conhecido até os anos 70. Entretanto muitas biocerâmicas não são materiais novos. Em 1972, um dentista brasileiro, Amadeo Bobbio, estudando fragmentos de uma mandíbula Maia com mais de 4000 anos, descoberta em 1931, constatou que alguns dentes tinham sido substituídos por um compósito de matriz cerâmica com 95 a 98% de carbonato e 2 a 5% de matéria orgânica composta por proteínas fibrosas. Em ortopedia, o uso de biocerâmica de forma controlada começou no século 19 com a utilização do gipsum para preenchimento ósseo [36]. O termo biocerâmica descreve um grupo de cerâmicas que são especialmente projetadas e fabricadas para reparar e reconstruir partes do corpo humano [38].

As cerâmicas incluem uma ampla gama de compostos que tiveram papel essencial no desenvolvimento dos biomateriais. As aplicações englobam as mais diversas áreas, como instrumentos de diagnóstico (termômetros, fibras para endoscopia), próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilo- -facial, válvulas cardíacas, traqueias artificiais e preenchimentos ósseos. O vasto campo de aplicação se deve, em grande parte, às propriedades cristalográficas e à superior compatibilidade química das cerâmicas com o meio fisiológico e com tecidos rígidos, como ossos e dentes [39, 34, 40].

Os biomateriais cerâmicos são classificados de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro, sendo divididos em bioinertes, porosos, bioativos e bioabsorvíveis. Os bioinertes, com base em suas propriedades físicas e mecânicas, são tolerados pelo organismo após serem implantados, sem resposta do organismo, como por exemplo, a alumina; nos porosos a interação com o tecido é através do crescimento interno de tecidos nos poros do material, como exemplo a hidroxiapatita porosa e os aluminatos; os bioabsorvíveis são substituídos por células em crescimento devido ao processo de degradação relacionado ao metabolismo (fosfatos tricálcico) e, por fim, os bioativos que auxiliam na cura devido a interagirem com o tecido circundante o que resulta no organismo em responder ao implante como se fosse um tecido natural, são exemplos desta forte ligação a hidroxiapatita, biovidro e vitro-cerâmicas [41, 34].

As matérias-primas utilizadas na fabricação de biocerâmicas podem ser naturais ou produtos químicos inorgânicos sintetizados por uma rota específica. No caso de produtos para aplicação biomédica, a necessidade de elevada pureza e controle,

determina, em geral, o uso de processo de síntese específico ou de seleção e beneficiamento da matéria-prima [35,42].

São exemplos de biocerâmicas a alumina densa (α -Al₂O₃), a zircônia (ZrO₂), o dióxido de titânio (TiO₂), fosfatos de cálcio, sendo a hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) mais estudada, e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio. Como exemplo de ocorrência em sistemas biológicos, se tem os fosfatos de cálcio, que podem ser: apatita, onde a relação de cálcio e fosfato pode variar; o fosfato octacálcico (OCP), com razão 1,33 (Ca/P); o monohidrogeno fosfato de cálcio monohidratado (DCPD), com razão 1,0 (Ca/ P); o fosfato tricálcico (TCP), com razão 1,5; e o pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD), com razão 1,0 [43, 34].

Biocerâmicas satisfazem necessidades tão diversas quanto: baixos coeficientes de atrito para a lubrificação de próteses de juntas, superfícies de válvulas de coração que evitam coagulação do sangue, materiais que estimulem o crescimento ósseo e aqueles que podem prender espécies radioativas para tratamentos terapêuticos [44].

A aplicação das biocerâmicas, assim como dos biomateriais de modo geral, depende da compatibilidade fisiológica, mas principalmente das propriedades mecânicas. A tabela 1 mostra duas propriedades mecânicas importantes para a aplicação das biocerâmicas no corpo humano, nesta pode se comparar o tecido rígido, com as algumas cerâmicas disponíveis para implante pelo módulo de elasticidade e pela resistência a tração, em GPa e MPa, respectivamente [28].

Tabela 2: Propriedades mecânicas do tecido rígido e das cerâmicas.

Tecido Rígido	Módulo de elasticidade (GPa)	Resistência a tração (MPa)
Osso cortical (direção longitudinal)	17.7	133.0
Osso cortical (direção transversal)	12.8	52.0
Osso trabecular	0.4	7.4
Esmalte	84.3	10.0
Dentina	11.0	39.3
Cerâmicas	Módulo de elasticidade (GPa)	Resistência a tração (MPa)
Alumina	360	300
Zircônia	220	820
Biovidro	35	42
HAp	95	50

Fonte: Adaptado de SOUZA (2012); PARK, 1992.

Se o implante possui módulo de elasticidade muito maior que o osso substituído pode ocorrer o stress shielding do osso paralelo ao implantado, fenômeno que enfraquece o osso na região em que a carga aplicada é menor ou está em compressão- o osso precisa estar sob tensão cíclica para permanecer saudável. Osso que sofre solicitação ou está em compressão experimentará uma mudança biológica que o conduzirá a resorção. O material que vai substituir o tecido vivo deve, portanto, apresentar módulo de elasticidade próximo ao do osso. Os tipos de osso de maior interesse para a utilização de biocerâmica são: cancellous ou trabecular (osso esponjoso) e o cortical (osso compacto). O módulo de elasticidade do osso cortical é de 10 a 50 vezes menor que o da alumina enquanto este mesmo módulo para o cancellous é, 300 vezes menor como assegura Hannouche et. al. (2003).

- Hidroxiapatita

A similaridade química e estrutural da hidroxiapatita com componentes minerais presentes nos ossos de humanos e nos dentes a torna um biomaterial reconhecido e amplamente aplicado em implantes [48], devido as seguintes propriedades de osteocondutividade, osteogênese, osteointegração e biocompatibilidade [49]. A limitação deste composto está relacionada à sua lenta biodegradação, que ocorre por mecanismos celulares gradualmente após 4 a 5 anos de implantação [6].

Os elementos que constituem a HAp são principalmente cálcio, fósforo e oxigênio, sendo a razão molar de cálcio por fósforo de 1,67. Apresenta a fórmula molecular de $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, sendo um composto formado por uma célula unitária hexagonal constituída por dez íons de cálcio em sítios não equivalentes, nos quais comportam quatro no sítio I (tetraédrico – Ca I) e seis no sítio II (octaédricos – Ca II). O sítio I é composto pelos íons de cálcio alinhados em colunas, já no sítio II os íons estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção do plano C da estrutura. Além disso, a estrutura é compreendida por tetraedros de PO_4^{3-} , no qual os íons de cálcio do sítio I são coordenados a seis átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros do íon fosfato [50]. Com isso, a célula unitária apresenta seis grupos fosfato $-\text{PO}_4$ e dois grupos hidroxila $-\text{OH}$, neste caso, os sítios cristalinos de oxigênio são designados como O1, O2, O3 e O4, sendo o O4 o oxigênio do grupo da hidroxila, já os demais são ligados ao fósforo – P. Os cristais de HAp naturais possuem célula unitária com parâmetros de rede: $a = b = 9,389 \text{ \AA}$ e $c = 6,869 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$ [52]. A rede cristalina da hidroxiapatita, pode ser observada na figura 4.

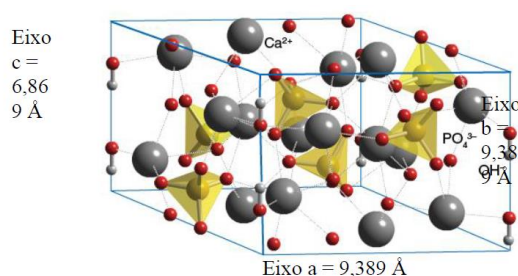


Figura 5: Rede Cristalina da hidroxiapatita
Fonte: CHEMTUBE, acesso em 15/01/2018.

A hidroxiapatita (HAp) é um mineral cerâmico encontrado no osso, que pode ser obtida sinteticamente. A HAp está presente em ossos e dentes de todos os vertebrados, representando 5% do peso total de um indivíduo adulto. Representa 55% da composição de ossos, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina.

As formas de obtenção da hidroxiapatita são várias e para cada método aplicado resultará em propriedades distintas, com isso é necessária uma escolha adequada para que ocorra o controle da estrutura e que o produto atenda ao propósito do estudo [53]. Diversos autores relatam a obtenção de hidroxiapatita por rotas de síntese por meio seco, via úmida, processos de baixas ou altas temperaturas, síntese com base em fontes biogênicas e processos combinados [50, 48, 49, 54, 55], sendo tais métodos com uso de ácidos, álcalis e/ou calor para o maior rendimento da separação da hidroxiapatita de fontes biológicas [55].

Apesar de todas as vantagens exibidas pela HAp, seu uso clínico é limitado devido à sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos, têm mostrado que a HA começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação. A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. Além disso, a HAp apresenta índice de bioatividade (Ib) igual a 3, sendo assim caracterizada apenas como bioativa, dentre os diferentes biomateriais, que também podem ser osteoprodutores, neste caso, haveria a colonização de superfícies por células tronco livres no ambiente defeituoso. O Ib é descrito como o tempo necessário para ocorrer 50% de ligação interfacial entre implante e tecido ósseo, ou o tempo necessário para a proliferação de tecido ósseo na presença de partículas bioativas [37].

3.2.2 Biopolímeros

Os polímeros possuem propriedades únicas, tais como viscosidade, maleabilidade, moldabilidade e resistência mecânica comparável às propriedades dos tecidos moles encontrados no corpo. Além disso, compósitos podem ser sintetizados para melhorar as propriedades do material e melhorar o desempenho dos implantes ósseos. Talvez a aplicação de cerâmicos nanofásicos na engenharia de tecido ósseo seja uma das mais viáveis [56].

Em biomateriais poliméricos para implante ósseo, a adição de partículas de biovidro, hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio tem o intuito de aumentar a biocompatibilidade e o módulo elástico da matriz. Com isto, as propriedades mecânicas do compósito tornam-se mais próximas às do osso, contribuindo para a redução do fenômeno stress-shielding [57, 58].

O uso de biopolímeros na elaboração de embalagens, também vem sendo aplicado e seu uso é condicionado pelas suas características físicas e pelas propriedades dos biofilmes obtidos, que são resultado de uma relação entre as características físico-químicas da macromolécula e a formulação utilizada. As aplicações desses filmes naturais podem ser diversas e variam no retardo da migração de umidade, gases e diversos compostos, além de fornecer integridade estrutural ou propriedades de manuseio [59].

Os polímeros comumente utilizados na produção de biomateriais, possuem a estruturas químicas dos meros constituintes de aplicações típicas, de origem sintética, como: Polietileno (PE), utilizado como tubos de drenagem e cateteres; o Polipropileno (PP), utilizado em suturas e reparo de hérnias; o Poli(tereftalato) de etileno (PET), utilizado em enxertos vasculares, reconstrução de ligamentos e fixação de implantes; o Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), utilizado em suturas e suporte para crescimento celular; o poli ϵ -caprolactona (PCL), utilizado como dispositivo para liberação de drogas e suporte para crescimento celular; Poli (cloreto de vinila) (PVC), utilizado em sacos para armazenamento de sangue; Poli(dimetilsiloxano) (PDMS), utilizado no suporte para crescimento celular; Poli (2-hidroxietilmetacrilato) (poli(HEMA)), utilizado em lentes de contato; Ácido hialurônico, utilizado como carreador de células, substituto de fluído sinovial; e a quitosana, utilizada em curativos, suporte para crescimento celular e dispositivo para liberação de drogas [31].

Outra fonte para biopolímeros, é a biológica, extraída de organismos vivos, como algas, plantas, animais e microrganismos. Está se apresenta como uma alternativa não

tóxica, que torna segura a utilização na constituição de biomateriais, além de apresentar um custo acessível por ser obtida de fontes renováveis. Entretanto, a variabilidade na matéria prima, com relação às espécies utilizadas e tempo de coleta, pode afetar as propriedades do produto, por isso, a purificação e o processo de extração é mais complexa, exigindo assim maior controle durante a fabricação para que não haja diferenças tão significativas de lote a lote [60, 61].

São exemplos de biopolímeros naturais, proteínas como o colágeno, a elastina, a fibrina e albumina, que são capazes de interagir favoravelmente com as células através dos domínios específicos de reconhecimento presentes na estrutura celular através de domínios específicos de reconhecimento presentes na estrutura celular [62,30].

Os polissacarídeos também vêm se destacando no uso médico, devido as suas propriedades como renovabilidade, biodegradabilidade e por mimetizar os componentes da matriz extracelular, o que os tornam elementos chaves em processos biológicos. Nesta classe, pode se destacar o ácido hialurônico, a quitosana, o alginato, a celulose, entre outros [63].

- Colágeno

O colágeno é um ingrediente com propriedade terapêutica e funcional, sendo uma proteína fibrosa encontrada em todo o reino animal, que contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Essas cadeias são organizadas de forma paralela a um eixo, formando as fibras de colágeno, que proporcionam resistência e elasticidade à estrutura presente. As proteínas colagenosas formam agregados supramoleculares (fibrilas, filamentos ou redes), sozinhas ou em conjunto com outras matrizes extracelulares. Sua principal função é contribuir com a integridade estrutural da matriz extracelular ou ajudar a fixar células na matriz [64, 65, 66].

O colágeno apresenta propriedades mecânicas singulares, e é quimicamente inerte. A composição do colágeno engloba todos os vinte aminoácidos embora algumas diferenças na composição de aminoácidos sejam evidentes nos colágenos derivados de diversas fontes. O colágeno é a única proteína de mamíferos que contém quantidades elevadas de hidroxiprolina e hidroxilisina, e o conteúdo total de iminoácido (prolina e hidroxiprolina) é alto [67, 68, 69]

Cerca de vinte e sete tipos diferentes de colágeno foram identificados, e uma simples classificação é mostrada na tabela 3. O colágeno é geralmente extraído com tratamento ácido e solubilizado sem alterar a sua tripla hélice. Contudo, o tratamento térmico cliva as pontes de hidrogênio que estabiliza a configuração da tripla hélice, e converte a sua conformação helicoidal em conformação espiralada resultando em gelatina [70]. A desnaturação do colágeno provoca a separação total ou parcial das cadeias devido à destruição das pontes de hidrogênio, causando a perda da conformação da tripla hélice. Portanto, o colágeno e a gelatina são diferentes formas da mesma macromolécula, e a gelatina é a forma parcialmente hidrolisada do colágeno [71].

Tabela 3: Tipos de colágeno.

Tipo	Descrição
Tipo I	Este tipo ocorre amplamente, principalmente no tecido conectivo, tais como a pele, ossos, tendões, córnea, grandes vasos, útero, derme, ligamentos, intestino, dentina e fibrocartilagem
Tipo II	Este tipo de colágeno ocorre quase exclusivamente no tecido cartilaginoso, cartilagem hialina e elástica, notocórdio e disco intervertebral.
Tipo III	Este tipo é fortemente dependente da idade: pele muito jovem pode conter até 50%, mas no decorrer do tempo, esta é reduzida para 5-10%. Grandes vasos, parede uterina, derme, intestino, válvula do coração e gengiva.
Outros Tipos	OS outros tipos de colágeno estão presentes apenas em quantidades muito reduzidas, principalmente em órgãos específicos. Lâminas basais, cápsula do cristalino, córnea, membranas da placenta, músculo do coração, pulmão, pele fetal, mucosa intestinal, etc.

Fonte: SCHRIEBER E GAREIS, 2007

A partir do colágeno tipo I são comumente obtidos o colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e o colágeno hidrolisado [64, 72]. Para fins de produção industrial, a gelatina é obtida do colágeno através da hidrólise ácida ou alcalina. Na extração ácida a gelatina obtida é classificada como Tipo A, apresenta ponto isoelétrico entre 7 e 9 e nesse processo ocorre a reorganização física da estrutura e mínimas alterações hidrolíticas resultando em ampla faixa de distribuição de massa molar.

A severidade do tratamento de extração é determinante para as propriedades funcionais da gelatina [73]. Gelatinas resultantes de extrações a maiores temperaturas apresentam perfil de massa molar menor do que as frações de gelatina resultante de extrações a menores temperaturas. Portanto, enquanto a composição de aminoácidos é principalmente dependente da espécie, a distribuição da massa molar da gelatina é fortemente dependente do processo de extração [74, 75].

Todos os tipos de gelatina possuem composição similar. No entanto, dependendo do material utilizado, do processo de pré-tratamento empregado e da intensidade da hidrólise, vários tipos de gelatina com propriedades diferentes podem ser obtidos. Por exemplo, quando o colágeno, independentemente do tipo, é submetido a temperaturas elevadas haverá uma menor quantidade ou falta de hidroxiprolina, pela perda da conformação de tripla hélice por temperaturas elevadas e posterior moagem. A hidroxiprolina, por sua vez, é um dos aminoácidos principais pela manutenção da estabilidade da tripla hélice (estrutura secundária do colágeno) [76].

Um novo ingrediente que está sendo estudado é a fibra de colágeno, que é obtida das camadas internas do couro bovino através de processo químico (tratamento alcalino com hidróxido de cálcio), segue para o desengorduramento e secagem a baixas temperaturas [77, 78]. Devido a sua forma física, a fibra tem a capacidade de reter água e confere textura e coesão, propriedade inexistente no colágeno hidrolisado (NOVAPROM, 2006) e por isso, a aplicação da fibra de colágeno proporciona vantagens funcionais como extensor e ligante de água [79]. A fibra de colágeno em pó é obtida por processo similar ao da fibra de colágeno, porém submetida a temperaturas mais elevadas e posterior moagem.

Um estudo realizado por Prestes et. al (2013), mostrou que a fibra de colágeno e a fibra de colágeno em pó, apresentaram maiores valores de proteínas (95,38 e 97,39%, respectivamente), hidroxiprolina (7,50 e 3,53%, respectivamente) e colágeno (60 e 28,25%, respectivamente), quando comparado com o colágeno hidrolisado e com a gelatina, indicando que esta forma sofre um dano estrutural menor, pela forma de obtenção, considerando que estes são de origem bovina.

3.2.3 Biocompósitos

Para suprir a crescente demanda de materiais com caráter renovável, biodegradável e sustentável, biomateriais estão sendo cada vez mais importantes para esse desenvolvimento, particularmente através sintetização de compósitos na sua formulação [81].

Os compósitos são materiais multifásicos cuja as propriedades sejam uma combinação benéfica (sinergia) das propriedades das duas ou mais fases que o constituem. As propriedades dos compósitos dependem de vários fatores como a geometria da fase dispersa. Os metais, por exemplo, apesar de não serem encontrados no corpo humano possuem resistência mecânica e relativa inatividade em relação às substâncias biológicas que podem ser os preferidos para substituir ossos fraturados. Os polímeros possuem propriedades únicas, tais como viscosidade, maleabilidade, moldabilidade e resistência mecânica comparável às propriedades dos tecidos moles encontrados no corpo. Além disso, compósitos podem ser sintetizados para melhorar as propriedades do material e melhorar o desempenho dos implantes ósseos. Talvez a aplicação de cerâmicos nanofásicos na engenharia de tecido ósseo seja uma das mais viáveis [56].

O desenvolvimento de compósitos de hidroxiapatita (HAp) / polímero é considerado uma abordagem interessante na área de biomateriais, pois a incorporação do colágeno melhora a confiabilidade e diminui a rigidez presente na HAp, considerando que o tecido ósseo consiste principalmente de HAp (78% em peso) e colágeno (20% em peso) esta é uma alternativa para substituição do tecido ósseo duro [82]. As propriedades da composição desse biomaterial devem também ser biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade (ou seja, esterilidade), bem como propriedades mecânicas semelhantes às características do osso natural. Biodegradabilidade desse composto resulta da bioreabsorção da fase polimérica, ou seja, característica das moléculas de colágeno para degradar no corpo e se envolver livremente nos processos metabólicos, sem deixar vestígios [83].

O autor Uskokovi em 2003, realizou uma pesquisa sintetizando um biocompósito de hidroxiapatita e colágeno, dando atenção ao à influência da temperatura e da pressão, através de prensagens a frio e a quente, utilizando temperaturas de 20°C e 60°C, respectivamente, ambas sob pressões de 49 MPa. Como resultado desta comparação, foi possível verificar que a síntese do compósito através do tratamento termomecânico não desnaturou a estrutura do colágeno a 60°C. Além disso, nessa temperatura houve uma maior coesão entre a cerâmica (HAp) e a fase polimérica (Colágena). Materiais alternativos poderiam ser elaborados através das variações da fonte da matéria prima, mudança nos parâmetros de sintetização e mudança nas fases dos materiais, como por exemplo, a substituição do colágeno em pó pela fibra de colágeno.

Segundo Maya e Thomas (2008), materiais compósitos reforçados com fibras naturais podem ter a resistência à tração e o módulo de elasticidade aumentado, até certo ponto. Além de este possuir outras vantagens como [85]:

- *Ambientais*: representam recursos renováveis e requerem pouca energia durante a produção;
- *Biológicas*: são produtos orgânicos naturais e pouco perigosos para a saúde, pois não originam efeitos dérmicos adversos no seu manuseamento e não apresentam perigo biológico aquando da sua alienação;
- *Tecnológicas*: têm boas propriedades mecânicas (ao nível do amortecimento e da rigidez, por exemplo), são mais leves, são dotados de boa capacidade de isolamento térmico, elétrico e acústico (devido à estrutura tubular das fibras, com muitos vazios), excelente desempenho a baixa temperatura, baixa dilatação térmica, versatilidade para formas 2D complexas, não abrasivos e dotados de grande flexibilidade de processamento;
- *Econômicas*: as biofibras são mais baratas do que as fibras sintéticas; sociais: têm benefícios ao nível da agricultura, porque constituem um rendimento secundário para os agricultores e também porque estão disponíveis a uma escala mundial, mais generalizada;
- *Risco*: as biofibras exibem um comportamento mais seguro em ensaio, menos suscetível de provocar acidentes durante a fragmentação e estilhaçamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada na pesquisa, escama e pele do *Arapaima Gigas*, foi obtida através do rejeito após o filamento do peixe comercializado por um frigorífico de pescado que trabalha com peixes de manejo na cidade de Manaus. A manta retirada com as escamas possuía um peso de 29 Kg e comprimento de 1,40 m. Onde foram extraídas também aproximadamente 500 escamas (figura 6).



Figura 6: Manta do Pirarucu após o filamento da carne

Fonte: Autor, 2017

Após a coleta, foi realizada a separação da escama da pele, manualmente, com o auxílio de uma pinça, para que a pele e a escama pudessem ser beneficiadas em processos distintos.

4.2 BENEFICIAMENTOS DAS ESCAMAS

4.2.1 Caracterização preliminar das escamas

Com o interesse de estudar a composição da escama do pirarucu, foi realizada uma análise prévia da escama “in- natura”, para verificar qual a estrutura e composição química da mesma, sem intervenção de tratamentos térmicos ou químicos. Além disso, esta escama possui uma parte branca e lisa, que fica em contato com o couro do pirarucu, e outra parte escura e rugosa, que fica em contato com o meio externo, protegendo o peixe de ataques de piranhas, por exemplo. Devido a essas características também foi verificado se havia diferença química e estrutural, entre a parte escura e a parte branca da escama.

Além disso, as escamas foram caracterizadas termicamente, através do equipamento SDT Q600 da *Ta Instrument*, localizado no laboratório de Ensaios Físico-Químicos/FT/UFAM. As amostras foram aferidas a aproximadamente 10 mg, a taxa de aquecimento foi de 10 °C/min até a temperatura final de 1000 °C, com fluxo de gás N 5.0 de 30 ml/min. O cadinho utilizado nos testes foi o de alumina de 90 microlitros sem tampa. Este analisou simultaneamente a perda de massa (TGA), a derivada térmica diferencial (DTA) e o diferencial calorimétrico (DSC) que compreende a medida de energia fornecida à substância e ao material de referência (inerte termicamente), que aumenta a temperatura em que a amostra e a referência estão submetidas, identificando

assim a ocorrência de mudanças físicas ou químicas, em que há liberação ou absorção de calor [86].

Para estudo da estrutura, foi realizado uma análise de DRX, no laboratório LabMAT (UFAM), utilizando o difratômetro de modelo da Panalytical (*Empyrean*), neste a amostra fica parada no centro ótico goniometro, enquanto o tubo de raio x e detector se movem de θ a 2θ , sendo utilizado um tubo de cobre como fonte de raio X, com comprimento de 1.5418 Å, utilizando um passo de 0.02 °/s, de 10 a 100 θ . Após a conclusão da leitura no difratômetro, os dados obtidos no programa *data collector* foram plotados no Software *Origin Plus 8.0*.

Para uma boa qualidade da análise, a amostra deve estar com a menor granulometria possível e possuir certa uniformidade no tamanho. Como a escama é um material duro a diminuição da granulometria da escama “*in-natura*” foi realizada com alicate. Sendo que esta havia sido previamente limpa com água destilada e seca em temperatura ambiente. Na Figura 7, é possível verificar a escama no porta amostra, tanto a parte externa (escura), como a interna (branca), ambas foram utilizadas com o objetivo de detectar se a maior exposição ao meio ambiente na origem da escama, afeta a estrutura da apatita.

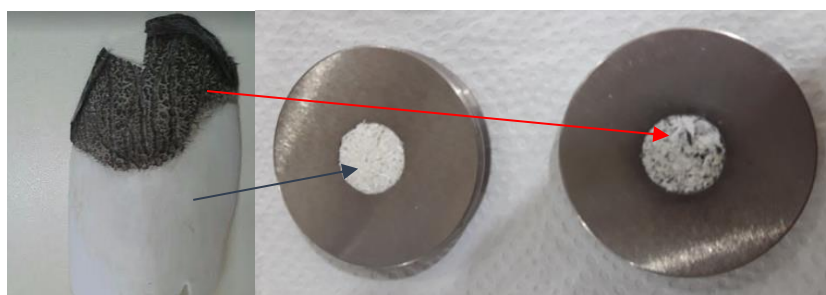


Figura 7: Amostras de Escama de Pirarucú para análise de DRX

Fonte: Autor, 2017

Para a análise química, pela absorção de raio X, foi utilizado o espectrômetro presente no laboratório LaMAC disponível para pesquisas na UFAM (Universidade Federal do Amazonas), da marca PANalytical, modelo EPSILON 3 XL (Tensão máxima: 50 Kv; Corrente máxima: 3 mA), que também opera com gás hélio há uma pressão 10 atm (10 kgf/cm²).

4.2.2 Limpeza das escamas

Foi realizada inicialmente uma lavagem com água corrente, com intuito de remover resíduos físicos das escamas. Em seguida, foi realizada uma segunda lavagem, com água previamente aquecida a 60°C, onde as escamas permaneceram imersas por aproximadamente 20 minutos, a fim de amolecer a parte escura da escama, que corresponde a uma carga orgânica que fica em contato com o meio ambiente. Esta foi posteriormente removida com o auxílio de uma escova, e em seguida, as escamas foram lavadas novamente com água quente, aproximadamente 10 litros de água foram utilizados nesse processo para a remoção da gordura e resíduos presentes.

Uma terceira lavagem foi realizada, com água deionizada, para retirar os minerais da superfície. Após esta etapa, as escamas ficaram submersas em uma solução de ácido cítrico 0.02%, na proporção de 1:2, durante 20 minutos, que serviu como um biocida e

auxilia na prevenção do crescimento de microrganismos nas escamas durante o manuseio e armazenamento.

Em seguida, foi retirado o excesso de água/ solução das escamas e estas foram colocadas em uma bandeja metálica para posteriormente ser levada a estufa, com circulação de ar, a 60°C, por 24 horas, para remoção da água superficial. Após a secagem as escamas foram armazenadas em sacos hermeticamente fechados.

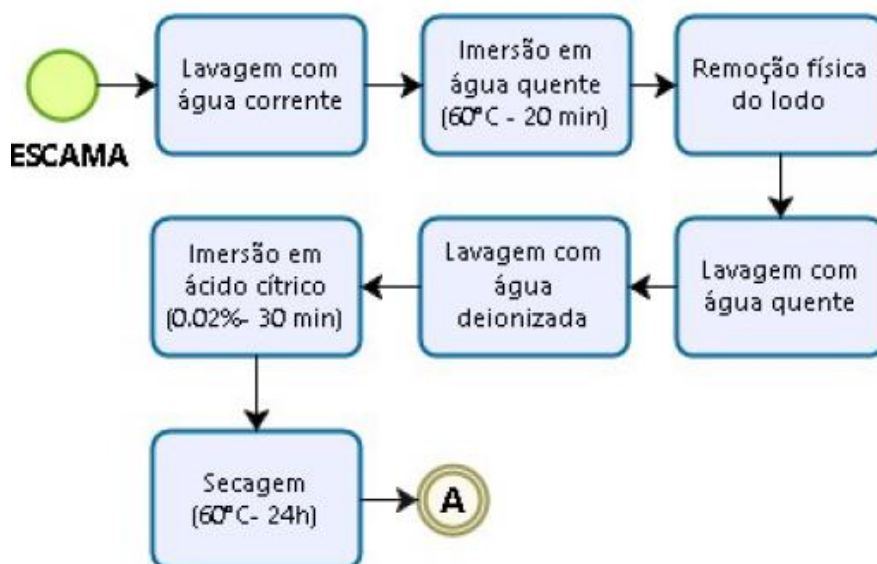


Figura 8: Fluxograma da Limpeza da escama

Fonte: Adaptado de Melo, 2017.

4.2.3 Extração da Hidroxiapatita (HAp)

As escamas serão tratadas para extração da hidroxiapatita, através de uma adaptação da metodologia empregada por Melo (2017), que utiliza o tratamento térmico-alcalino para a desproteínização da escama da tilápia e obtenção da HAp natural. O tratamento térmico- alcalino pode gerar certas modificações na estrutura, visto que os compostos alcalinos agem como catalizadores.

A escama do pirarucu consiste em um material de certa dureza e flexibilidade, que inviabilizam a moagem em moinhos comuns. Devido a estas características físicas antes do início do tratamento térmico-alcalino, foi realizada uma calcinação, visando à obtenção de um pó e remoção da água estrutural, onde o tamanho dos grãos foi padronizado com o peneiramento.

A escolha da temperatura de calcinação teve como base a análise térmica, realizada da escama “in- natura”, onde foi verificado que a perda de massa estabilizou em aproximadamente 700°C. Além disso, foram realizados alguns testes, para avaliar a estrutura da HAp, com temperatura de calcinação e tempo de permanência diferente. A fim de estabelecer qual o parâmetro ideal na obtenção do pó. Como critério de aceitação, foi avaliado não só o padrão de difração, como também o tamanho do cristalito, obtido através do refinamento de Rietveld. Após a calcinação, o tratamento teve início com um pré-tratamento ácido, no qual foi utilizado ácido clorídrico 0.1M, sob agitação, utilizando

um agitador magnético, a 600 rpm, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução de HAp natural, foi neutralizada para início do tratamento alcalino, com hidróxido de sódio 5% (m/v), por cinco horas, com velocidade constante de 600 rpm e temperatura de 70°C.

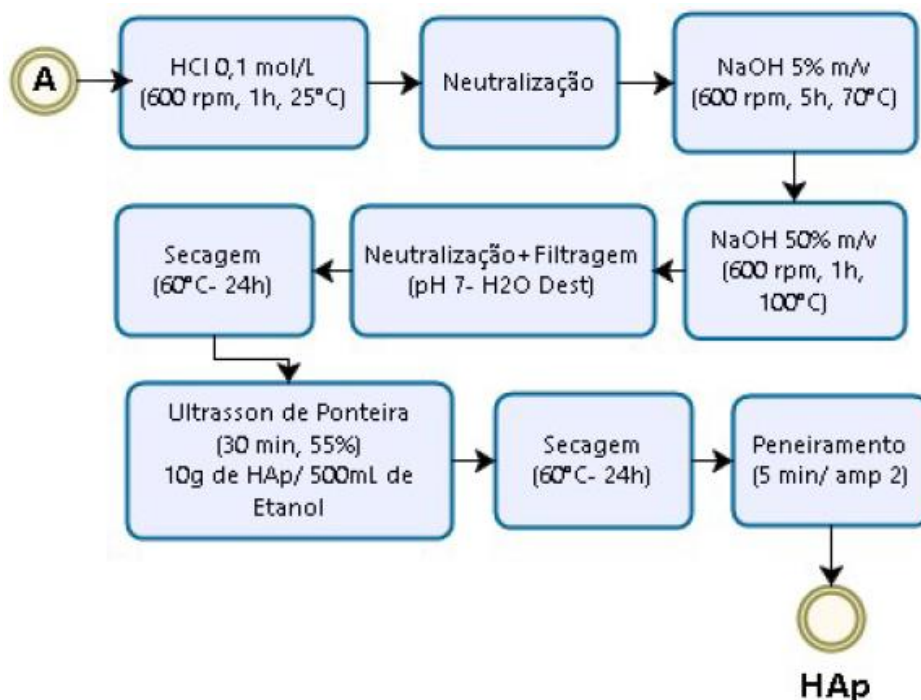


Figura 9: Fluxograma do Tratamento Térmico-Alcalino
Fonte: Adaptado de Melo, 2017

O tratamento teve continuidade com uma solução com concentração maior de hidróxido de sódio, 50 %, sob mesma agitação, com a temperatura elevada a 100°C, por uma hora. Posteriormente, a solução foi filtrada e lavada no kitassato com água destilada até neutralização do pH em 7.0, para que então pó (HAp) fosse seca por 24 horas a 60°C. Após a secagem, o pó obtido é submerso em álcool etílico (99.3 %), em uma proporção de 10g/500 mL, sob o efeito de um Sonificador Ultrassônico (ECO-SONICS), modelo QR 1000, por 30 minutos com 55% de potência. Por fim, o pó é filtrado e novamente seco, a 60°C, por 24 horas, para que este possa ser homogeneizado em almofariz de ágata e peneirado para padronização da granulometria com a peneira de abertura 45 mm (325 mesh).

4.2.4 Caracterização da HAp

Na caracterização da HAp, também foi utilizado as técnicas de DRX e FRX, seguindo as mesmas condições de análise da escama, nos mesmos equipamentos. No entanto, também foi realizado também uma análise de infravermelho com transformada de Fourier, utilizando um espectrômetro Thermo Electron (modelo Nicoletti S10), com 32 varreduras na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Cada amostra foi misturada com KBr na proporção 1:100 e prensada em disco na pressão 80 KN e por 1 min. Neste os espectros de absorção, emissão e reflexão de espécies moleculares podem ser racionalizados assumindo-se que todos se originam de numerosas variações de energia

produzidas por transações de moléculas de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro, possibilitando assim a identificação dos mesmos no material estudado [87].

A HAp natural também foi avaliada quanto a sua distribuição e tamanho de partículas, visto que este é um parâmetro fundamental para muitas operações de produção e processamento envolvendo sistema de materiais particulados, além de influir na microestrutura do material, afetando a resistência mecânica, a densidade e as propriedades térmicas e elétricas dos produtos acabados. Portanto a sua determinação é uma etapa crítica em todos os processos pois podem gerar perdas econômicas decorrentes de produtos com baixa qualidade com alta taxa de rejeição nos processos de compactação [88]. Para esta foi utilizado um Analisador de Partículas Beckman Coulter, modelo LS 13 320. Para análise foi pesado 0,2 gramas de HAp natural, com alvo 17”, inferior 16” e superior 18”, com obscuração de 4%, por 21 segundos com vácuo médio em água.

4.3 BENEFICIAMENTO DA PELE

4.3.1 Limpeza e conservação da pele

Primeiramente, foi realizada uma limpeza com água corrente, com o intuito de remover resíduos físicos presentes, conforme a figura 8. A pele foi cortada em pedaços pequenos para o tratamento de 0.5 x 0.5 cm², com o uso de uma tesoura de corte, própria para alimentos. Em seguida a pele foi congelada, há -20°C para cessar a atividade metabólica e crescimento microbiano, para conservação no freezer com temperatura controlada até a extração do colágeno.



Figura 10: Pele do Pirarucu sem escamas

Fonte: Autor, 2018

4.3.2 Caracterização preliminar da pele do pirarucu

A pele foi caracterizada preliminarmente quanto ao seu comportamento térmico, através das análises de DSC/TGA, conforme abordado na seção de técnicas de caracterização deste trabalho, com a faixa de temperatura de 20 a 900°C e taxa de aquecimento de 10°C/min utilizando fluxo de nitrogênio 50 ml/min.

4.3.3 Extração do Colágeno

Para extração da gelatina foi utilizado uma metodologia adaptada de LIU et. al. (2015), que testou o efeito do pré-tratamento alcalino e da extração ácida em diferentes níveis, na extração do colágeno da tilápia. Com o pirarucu, foi utilizado os parâmetros de maior eficiência neste estudo, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 0.5 M para a remoção das proteínas não colagenosas a 20°C.

Em seguida, a pele foi neutralizada, com água destilada, gelada e imersa sob agitação em uma solução de álcool butílico a 10%, por 48 horas, trocando a solução a cada 12 horas, com a proporção de 1:20 (m/v), esta etapa de pré- tratamento, pode ser visualizada na área azul do fluxograma na figura 11.

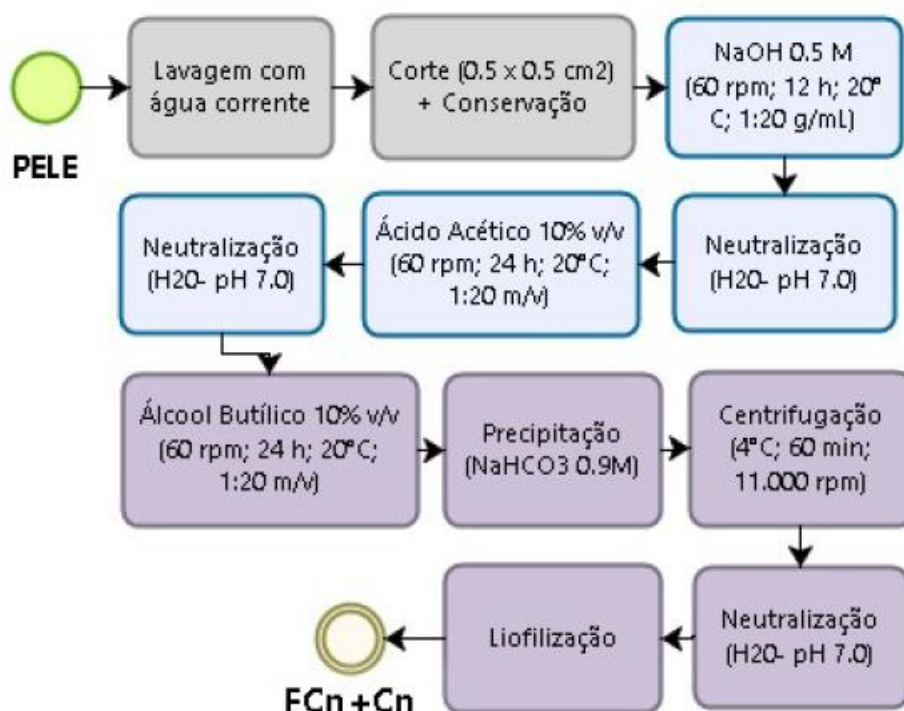


Figura 11: Fluxograma da Extração ácida do colágeno

Fonte: LIU et. al. (2015).

Posteriormente, a pele passou por uma extração ácida, com ácido acético (CH_3COOH) 0.5 M, a 20°C, por 72 horas com troca de solução a cada 24 horas, na proporção de 1:40 (m/v). O resultado da reação da pele com o ácido acético no tempo estipulado é um líquido viscoso, que contém colágeno e alguns sais, este a cada troca de solução foi reservado e conservado, com vedação utilizando *parafilm*, a temperatura de 4°C. No fim da extração, a pele representada na figura 12, é descartada.



Figura 12: Pele durante extração ácida

Fonte: Autor, 2018

Em seguida, para que ocorra a precipitação do colágeno, é necessário que o pH atinja a faixa básica de 8 a 9, para tal, foi utilizado uma solução de bicarbonato de sódio 0.9 M (com o pH corrigido para 10, utilizando hidróxido de sódio 2 N).

Com o colágeno precipitado, a solução foi centrifugada, com rotação de 11.000 rpm, por 60 minutos com temperatura controlada de 4°C, da marca Hitachi, modelo CR21GIII. Por fim, o colágeno em pó é liofilizado, por 72 horas, para que a água superficial seja completamente removida, auxiliando assim no processo de preservação até o uso e substituindo o processo de secagem convencional. O produto obtido foi armazenado em frascos de vidro, hermeticamente vedados.

4.3.3 Caracterização do colágeno

O colágeno obtido foi caracterizado através do teor de proteínas, onde a concentração de proteínas foi determinada utilizando um kit 2-D- Quant. Este kit foi projetado para a determinação precisa da concentração de proteínas em amostras preparadas para técnicas de eletroforese, como eletroforese em 2D, SDS-PAGE ou IEF. Para determinação é realizado uma precipitação quantitativa de proteínas, deixando substâncias interferentes decantadas. O ensaio se baseia na ligação específica de íons de cobre à proteína, cujo as proteínas precipitadas são ressuspensas em uma solução contendo cobre e o cobre não ligado é medido com um agente colorimétrico. A absorvância a 480 nm está inversamente relacionada à concentração de proteína, sendo que o ensaio tem uma resposta linear à proteína com um volume na faixa de 0 a 50 µg.

Além disso, o colágeno foi caracterizado quanto a sua umidade, através da Titulação Karl Fisher, que possibilita a obtenção precisa do teor de água dos materiais utilizando o modelo KF V30S da Mettler Toledo.

A análise dos compostos no infravermelho com transformada de Fourier foi realizada na mesma faixa da caracterização da pele de 400 a 4000 cm⁻¹. Da mesma forma, foi realizado uma nova análise térmica DSC/TGA, para identificar o perfil de degradação do colágeno obtido.

4.4 OBTENÇÃO DO BIOCOMPÓSITO

O biocompósito nano-estruturado foi formado a partir de três diferentes composições variando a proporção em 15, 30 e 45% fibra de colágeno em hidroxiapatita, que estará sempre em maior proporção, conforme detalhado na tabela 4.

Tabela 4: Proporções da formação do compósito

Run	FCn	HAp	Proporção	Microdureza	Biodegradabilidade
1	15%	85%	1,5/10	X1	A1
2	30%	70%	3.0/10	X2	A2
3	45%	55%	4.5/10	X3	A3

Fonte: Autor, 2018.

Os corpos para estudo das propriedades mecânicas foram obtidos por prensagem uniaxial e isostática, sem sinterização para que não haja a degradação do colágeno. Para análise do efeito das proporções do colágeno no biomaterial, será utilizado o programa *Minitab*, para verificar a probabilidade de aceitação da hipótese e o efeito da variação do colágeno nas propriedades mecânicas.

Como análise prévia, para formação do corpo de prova, foi realizado uma análise granulométrica a laser a fim de identificar o tamanho e distribuição das partículas da HAp. Nesta técnica as partículas são dispersas num fluído em movimento causando descontinuidades no fluxo do fluído, que são detectadas por uma luz incidente e correlacionadas com o tamanho de partícula. Para esta análise as amostras foram previamente maceradas em almofariz de ágata e peneiradas na malha 45 ABNT de abertura 0,35 mm, a fim de evitar um espalhamento alto no espectro de difração, que ocasiona erros de leitura, pelo sombreamento de partículas maiores. Foi utilizado o analisador de sólidos de bancada, modelo LSTM 13 320 MW, faixa de detecção (0,04 a 2500 µm), com a amostra dispersa em álcool isopropílico e submissão a agitação por ultrassom durante 180 segundos para desaglomeração das partículas. Com o resultado dessa análise será possível avaliar se haverá o empacotamento teórico do material, além das possibilidades de mistura.

Os estudos teóricos e experimentais relacionados ao empacotamento de partículas resultaram de duas abordagens básicas: uma discreta, que considera as partículas individualmente (modelo de Furnas, equação 2); e outra contínua, que trata as partículas como distribuições contínuas (modelo de *Andreasen*, equação 3).

$$CPFT (\%) = 100 \frac{D^{\log r} - D_S^{\log r}}{D_L^{\log r} - D_S^{\log r}} \quad (2)$$

Onde CPFT é a porcentagem volumétrica de partículas menores que o diâmetro D, DL é o diâmetro da maior partícula, DS é o diâmetro da menor partícula, r é a razão entre o volume de partículas entre duas malhas de peneiras consecutivas e q é o módulo ou coeficiente de distribuição.

$$CPFT (\%) = 100 \left(\frac{D}{DL} \right)^q \quad (3)$$

Por meio de simulações computacionais foi verificado que valores de “q” menores ou iguais a 0,37 podem favorecer o empacotamento máximo para distribuições infinitas, enquanto que para valores acima de 0,37, verifica-se sempre uma porosidade residual. Para uma mistura apresentar boa capacidade de escoamento, o valor do coeficiente de distribuição deve ser menor que 0,30; assim, a consideração de q com valores próximos a 0,30 favorece a produção de concretos adensados sob vibração, enquanto que valores menores que 0,25 resulta em misturas auto adensáveis [89].

4.4.1 Teste de biodegradabilidade

Para examinar a biodegradabilidade do compósito, foi realizado um teste de estabilidade utilizando uma solução salina, que simula os fluídos corporais, em uma estufa com temperatura constante, a 36.5°C. Para realização do experimento, foi pesado 45mg do biocompósito em 10 mL de solução, no qual a massa foi pesada a cada 24 horas, por um período de 22 dias, em triplicata para cada concentração 15, 30 e 45%.

A solução salina, também conhecida como SBF, do inglês, *simulated body fluid*, será preparada de acordo com a metodologia empregada por Smith et. Al (2018), com a adição de 7.996g de NaCl, 0.350 g de NaHCO₃, 0.244g de KCl, 0.228 g de K₂HPO₄. 3H₂O, 0.305 g de MgCl₂. 6H₂O, 40 mL de HCl (1M), 0.278g de CaCl₂, 0.071g de Na₂SO₄ e 6.057 g (CH₂OH)₃ CNH₂. O pH desta solução foi ajustado para 7.4 com adição de HCl 1 M, o volume total desta solução é 1L e permaneceu armazenado a 4°C, até utilização e a cada troca foi filtrada utilizando um filtro absoluto (bacteriológico) de 10 x 0.22 micras.

4.4.2 Ensaio Mecânico

i) Microdureza

A microdureza é uma característica do material que sofre influência da porosidade e pode ser relacionada com a tenacidade a fratura. Os testes para determinar a dureza foram baseados na resistência do material à deformação permanente na forma de penetração ou indentação. Vários são os métodos usados, neste estudo, será realizado o teste de microdureza de Vickers. O termo micro refere-se ao tamanho do indentador e não ao valor da dureza. Neste teste o local de medição pode ser selecionado com alta precisão e um pequeno penetrador de diamante, com determinada carga é levado a pressionar o material [90].

Para determinação da microdureza de Vickers (HV) foi utilizado um microdurômetro Shimadzu HMV Micro-Hardness, com a aplicação de carga de 1,96N por 15 segundos. O valor de HV é deduzido, a partir do tamanho médio das diagonais impressas pelo indentador piramidal de base quadrada, aplicado sobre a superfície polida da amostra, segundo a equação abaixo, estabelecida pela norma ASTM C1327-08.

$$HV=0,0018544. P(l)^2 \quad (4)$$

Onde P é a carga aplicada (em N), l é o valor das diagonais impressas (em mm), HV é a microdureza (em GPa). Segundo Black e Kohsher (2008), o ensaio de microdureza pode sofrer influência, pelo tamanho e morfologia do grão: Quanto menor e mais alongado maior a dureza; pela carga aplicada: a taxa de aplicação não pode produzir componentes laterais no movimento do indentador; pela quantidade de impurezas: a presença de elementos estranhos à composição deve aumentar ou diminuir a dureza, principalmente se houver formação de fase vítrea; e pela porosidade: a presença de poros diminui o volume de resistência, o que acarreta diminuição na dureza.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Beneficiamento da escama

i) Análise Térmica

Para conhecimento do comportamento térmico da escama foi realizado uma análise termogravimétrica, representada pela figura 13, onde o eixo principal do diagrama reproduz a perda de massa em percentual, pela técnica de termo gravimetria (TGA), o eixo das abscissas a temperatura em função do tempo e o eixo secundário a variação de energia (fluxo de calor), traduzido pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC).

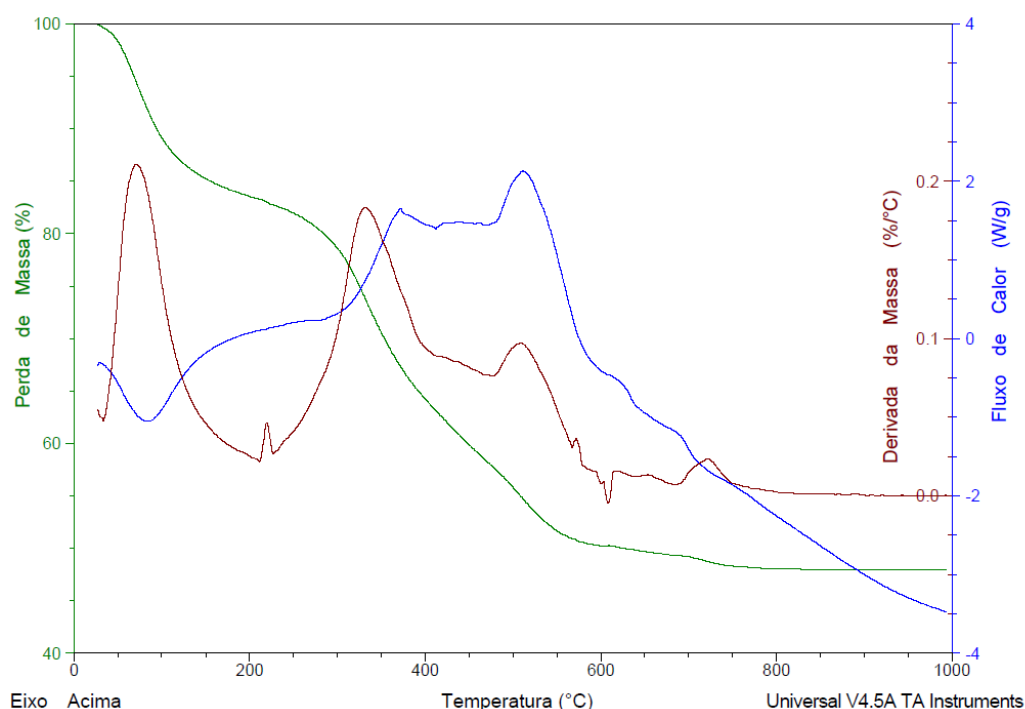


Figura 13: Análise Termogravimétrica da Escama do Pirarucu

Fonte: Autor, 2018

Com base na curva de perda de massa por temperatura ($\%/^{\circ}\text{C}$), é possível visualizar os eventos térmicos principais. O primeiro, em torno de 100°C , em que ocorre a perda de 13% de massa equivalente a água e outros compostos voláteis.

No estudo de Santos et. al (2013) foi observado em filmes de gelatina de Tilápia, em torno de 95°C ocorre o início da fusão da estrutura de colágeno. Para Wong (1995), a estabilidade térmica do colágeno está relacionada com seu conteúdo de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina). Quanto mais elevado o conteúdo de aminoácidos maior é a estabilidade das hélices. O colágeno se desnatura a temperaturas superiores gerando uma mescla de espécies com uma, duas ou três cadeias polipeptídicas enroladas ao acaso, dependendo da fonte do material.

O estudo realizado por Lancelotti (2014) avalia o colágeno extraído da uva, este observa uma elevada perda de massa e desnaturação do colágeno na faixa de 430 a 680°C , onde a perda varia de 44 a 50%.

Tal similaridade, com o comportamento térmico da escama do Pirarucu, corrobora com a hipótese de Meyers em 2012, que justifica a alta resistência das escamas do Pirarucu, devido a presença de fibras entrelaçadas de colágeno. De maneira que para a escama do Pirarucu, é possível verificar o início deste evento térmico em torno de 325°C, onde pode se inferir de acordo com a literatura, o início da mudança de fase das cargas orgânicas presentes na escama do Pirarucu, no qual também há uma perda acentuada de massa até 500°C, no qual a energia induzida foi suficiente para desproteção das proteínas colagenosas da escama, com perda de massa média de 30%.

Em 700°C, é possível verificar o derradeiro evento, caracterizado por uma perda de massa menor, sendo que a partir deste a curva de massa (%), tende a estabilização eventos até a temperatura analisada de 1000°C. Neste é possível inferir a decomposição de óxidos e carbonatos de cálcio, cessando em uma perda de 52% de massa até 1000°C, os autores Sanders e Gallagher em 2002, observaram uma decomposição similar para CaCO_3 , em torno de 700°C.

Com base nestes resultados e conforme já relatado por Torres (2012), o percentual restante de massa é respectivo a fase inorgânica, mineral e cristalina da escama (HAp). Para que não houvesse perda de fase mineral, foi escolhido como patamar para o tratamento térmico da escama, a temperatura de 1000°C, considerando que a amostra seja aquecida com temperatura inicial em 25°C, como tratamento e eliminação dos compostos não relevantes para a obtenção da HAp natural.

ii) Difração de Raio-X

A figura 14, representa o difratograma da parte escura e da parte branca da escama “in-natura”.

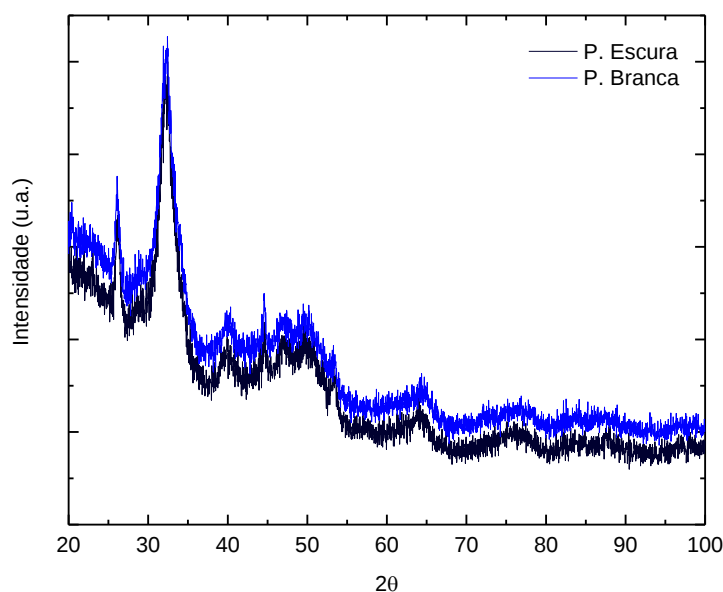


Figura 14: Difração de Raio-X da Escama de Pirarucu “in- natura”

Fonte: Autor, 2018.

Por meio deste, foi possível verificar que a escama “in-natura” possui uma estrutura com fase cristalina, com cristalitos menores quando comparado com a hidroxiapatita calcinada, com ângulos característicos dos compostos de apatita, caracterizados no gráfico com o asterisco, nos ângulos: 26, 32, 39 e 44°.

Além disso, não é percebido, uma diferença estrutural, entre a parte escura e a parte branca da escama, o que sugere que a diferença pode ser somente na composição orgânica, visto que a parte escura fica exposta ao meio e a parte branca que fica entrelaçada internamente na pele do pirarucu.

Para definição da temperatura do tratamento térmico, foi realizado uma calcinação preliminar, a 700°C e a 1000°C, com base na análise térmica realizada na escama do pirarucu, visto que em outras literaturas, dentro desta faixa é propiciado a formação de HAp cristalina como no tratamento realizado pelo autor Weinand (2009), que obteve a HAp natural, com a calcinação a 900°C. Esta análise, está representada na figura 15, com o eixo das ordenadas normalizado pela divisão do número máximo. Este difratograma indica a presença de fase cristalina, que se assemelha ao padrão de HAp já registrado na base de dados do ICSD (Inorganic Crystal Structures Database), de número 56307, catalogado pelo autor Saeger e Kuhs (1992).

Também é possível inferir que a calcinação acima de 700°C com tempo de permanência de 4 horas não afeta a maioria dos picos presentes na estrutura da hidroxiapatita, considerando que a 700°C é observado um pico de baixa intensidade, no ângulo de 37°, que pode estar relacionado a decomposição de alguma matéria orgânica presente na escama, levando em consideração que esta decomposição também foi observada na análise termogravimétrica. Este pico também não é detectado no padrão 56307 e na calcinação a 1000°C, este fator foi confirmado com a análise qualitativa por fluorescência de raio-X, que mostrou que o percentual presente é tolerável para a HAp natural, conforme já relatado por outros autores.

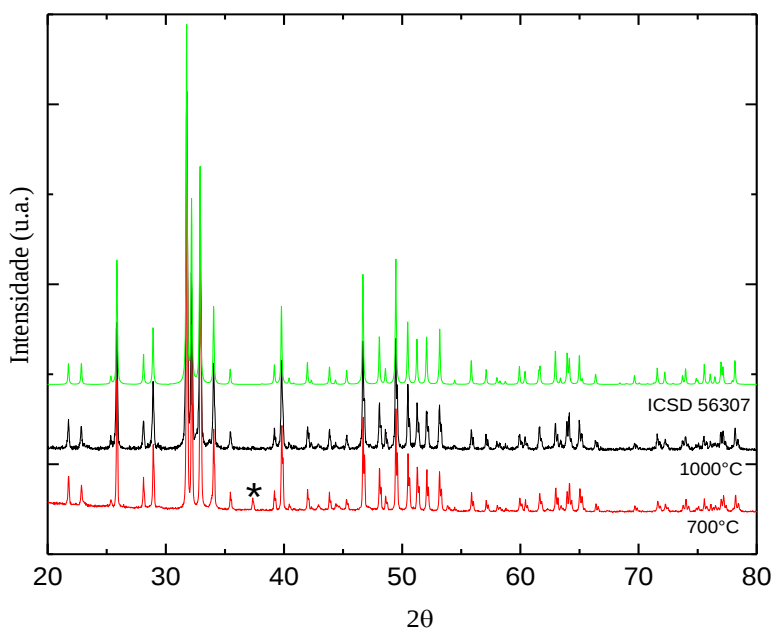


Figura 15: Difração de Raio-X da escama calcinada a 700°C e a 1000°C, com ICSD 56307

Fonte: Autor, 2018.

iii) Análise de Fluorescência de Raio-X

Os dados obtidos do efeito da fluorescência foram convertidos pelo software *Epsilon 3*, onde foi obtido um espectro de energia dispersiva e uma tabela com os percentuais encontrados de cada elemento. Com estes dados foi possível visualizar que a

escama calcinada a 1000°C, apresenta a composição elementar que indica a presença hidroxiapatita, pelos elementos: cálcio, fosfato, oxigênio e de magnésio e sódio. Estas concentrações podem ser observadas na tabela 5, na qual a coluna Wt%, representa o percentual em massa de cada elemento, a coluna At%, representa a massa atômica e a coluna Int.Error, representa o erro relativo a intensidade gerada em cada concentração, em que mostra um erro maior nos elementos encontrados em menor quantidade.

Tabela 5: Quantificação dos elementos presentes na HAp

Elemento	Wt%	At%	Int. Error
O	59,2	75,79	0,1
Ca	23,45	11,98	0,3
P	15,68	10,37	0,3
Na	0,84	0,74	0,1
Mg	0,82	0,69	0,2
Total	100,0	100,0	-

Fonte: Autor, 2018.

A autora Melo em 2016, também determinou os minerais presentes na escama da tilápia. Nesta escama, também foi possível identificar a presença de sódio e magnésio, dentro dos limites de detecção, representando 0.84 e 0.82 wt%, respectivamente. Estes valores podem variar de acordo com a região e características da fonte biogênica, onde o clima, a alimentação e os sais presentes na água afetaram no percentual de sais encontrados na escama.

Ainda que haja a presença de outros sais na composição da HAp, a razão molar de Ca/P encontrada está em 1.5, se enquadrando assim na faixa estipulada para a hidroxiapatita, que compreende a razões molares de 1.5 a 1.67, de acordo com Fulmer et. al (1992). No entanto, alguns autores como Dorozhkin (2002), relatam essa razão como uma fase da hidroxiapatita deficiente em cálcio.

iv) Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A transmitância gerada pela análise de infravermelho, representado na figura 16, identifica os principais grupos funcionais da hidroxiapatita em um intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} . Neste é possível verificar que a maior incidência de transmitância dos compostos é no range de 1450 a 550 cm^{-1} respectivo aos principais compostos da hidroxiapatita que são as bandas do fosfato (PO_4^{3-}), carbonato (CO_3^{2-}) e hidroxila (OH^-). A banda 1649 cm^{-1} refere-se ao grupo OH^- , produzido pela deformação da molécula de H_2O no processo de síntese. Os resultados obtidos no espectro estão de acordo com a literatura [99, 100, 101, 102].

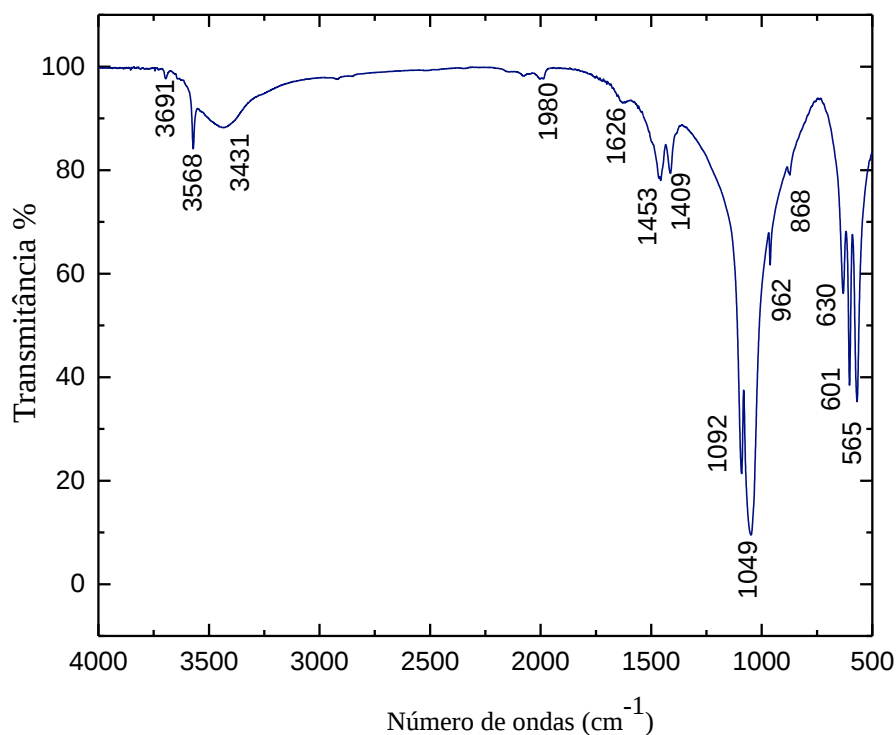


Figura 16: Espectro de FT-IR da escama do Pirarucu
Fonte: Autor, 2018

v) MEV-FEG ZEIS

A figura 17 representa um mapa de acordo com a incidência dos elementos da metodologia FEG da HAp natural, onde é possível verificar a distribuição dos íons de cálcio, magnésio, sódio e fosfato. Como complemento no conjunto de imagens da figura 18 é possível verificar aglomerados de partículas com grandeza menor que 2 μm , figura 18(a) com ampliação de 5000X, menor que 1 μm , figura 18(b) com ampliação de 10000X, com dimensões e cristalitas que variam em uma escala maior e menor que 200 nm, conforme se observa na figura 18(c) com ampliação de 20000X.

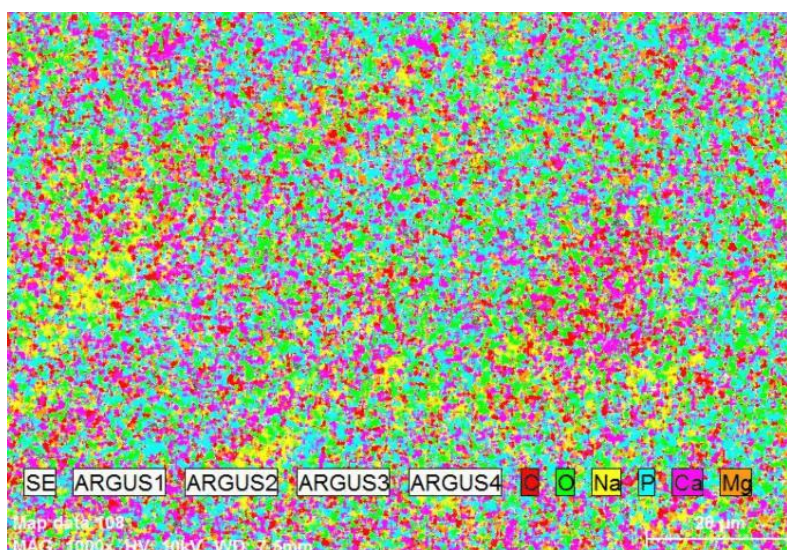


Figura 17: Mapa FEG- HAp Natural- 1000°C
Fonte: Autor, 2018.

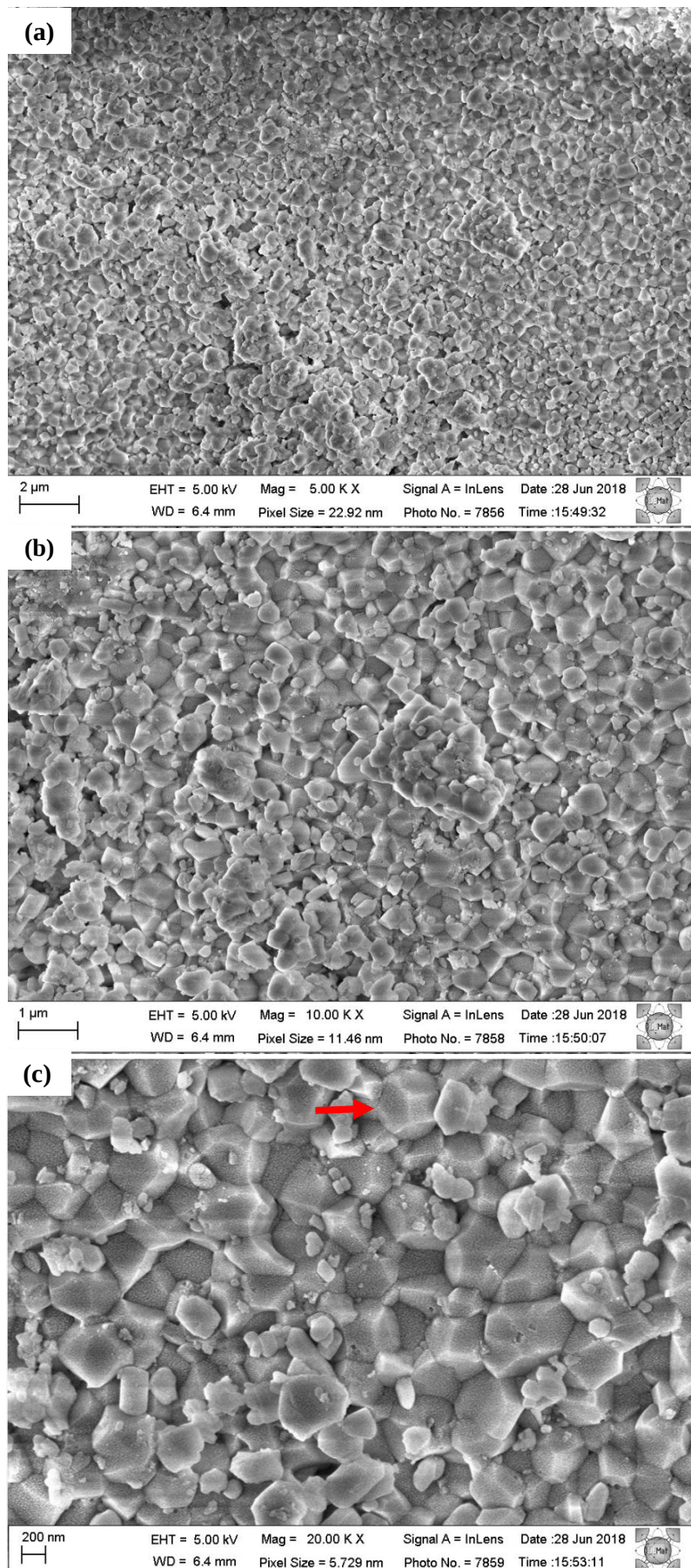


Figura 18: Micrografias-MEV de partículas de HAp Natural a 1000°C:
(a) 5000X, (b) 10000X e (c) 20000X.

Fonte: Autor, 2018.

A forma comum observada das partículas varia de lamelar (*flakes*) a angular, de acordo com o padronizado por German (1994), além de que se observa na figura 18(c) um cristalito hexagonal que confirma o padrão discutido na análise de difração de Raio X.

Estas estão dispostas em aglomerados que também foram evidenciados pela pesquisa dos autores Santos, Florentino e Saeki (2005), na qual os autores relatam a aglomeração como benéfica para a formação de poros submicrométricos entre si, que permitem a circulação do fluído corporal, dentro do material, facilitando a adesão e osteocondução.

vi) Análise da distribuição das partículas

Comumente para analisar a distribuição no tamanho das partículas os dados utilizados são os gráficos de distribuição de frequência acumulada e incrementais e os decis: D10, D50 e D90 que correspondem, respectivamente, aos valores que 10, 50 e 90% da distribuição das partículas apresentam diâmetros menores. Na figura 19 é possível visualizar a distribuição das partículas onde o eixo y, representa o volume em percentual e o eixo X representa o diâmetro da partícula em μm .

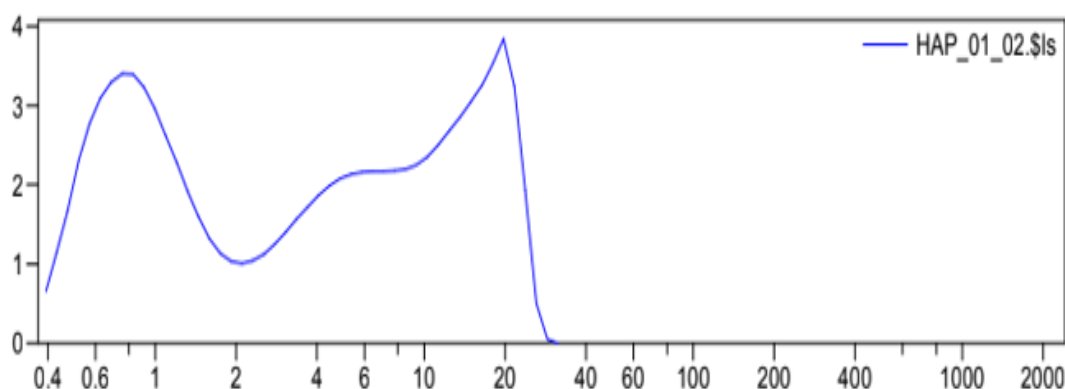


Figura 19: Distribuição média das partículas de HAp (1000°C)

Fonte: Autor, 2018.

Para interpretação pode se considerar o diâmetro das partículas com os respectivos percentuais em: <10%= 0,63 μm ; <50%= 4,07 μm ; <90%= 18,66 μm ; <99%= 24,44 μm ; e 100%= 30,07 μm . Foi possível verificar também os valores de média, mediana e moda, em 6,94, 4,07 e 19,76 μm , respectivamente.

Considerando que para análise, foi coletado uma amostra sem peneiramento após a etapa de tratamento, os valores encontrados, principalmente na mediana da amostra, 19,76 μm , reforçam a necessidade de peneiramento antes do preparo do biocompósito, onde pode ser útil a separação acima de 2 μm , visto que no range de 0.4 a 2 μm , é possível verificar que a distribuição tende a ser normal, característica considerada benéfica para o empacotamento e adesão dos grãos na matriz de fibra de colágeno.

5.2 Beneficiamento da Pele

i) Análise Térmica da Pele do Pirarucu

Os eventos termodinâmicos da pele do Pirarucu, podem ser divididos em quatro partes (figura 20), o primeiro, de 50 a 125°C, apresenta um comportamento endotérmico, e representa cerca de 45% da perda de massa provavelmente gerado por uma ação de desidratação, o autor Corrêa et. al. (2013), considera também que a perda de massa até 175°C, pode ser referente à evaporação de diferentes compostos voláteis, incluindo água e algumas proteínas da gelatina de colágeno, visto que a água associada ao interior ou da superfície da tripla hélice, pelas ligações de hidrogênio, ou até mesmo água situada entre as camadas de proteínas.

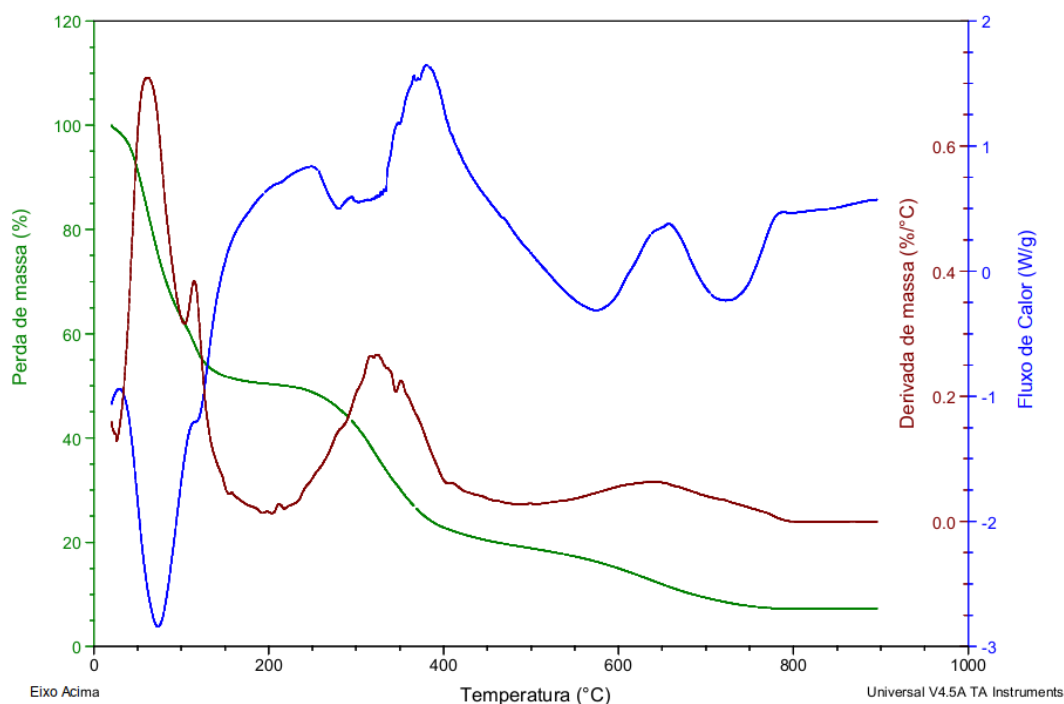


Figura 20: Análise Termogravimétrica da Pele do Pirarucu

Fonte: Autor, 2018

Acima de 200°C, é possível verificar uma sucessão de reações termodinâmicas, devido ao alargamento dos picos onde em torno de 300 a 570°C, ocorre uma liberação de calor latente, representada pelo pico exotérmico, que pode ter sido gerado pela desnaturação de proteínas e gorduras, visto que ao final deste evento a perda de massa representa cerca de 90%. Melo (2017), também observou uma perda de massa em 332°C, a autora atribuiu este evento a degradação térmica da gelatina de colágeno.

Em seguida, há a presença de mais duas liberações de energia uma que vai até cerca de 725°C e a outra próxima a 800°C, onde está tende a se estabilizar, além de que a perda de massa nestes dois eventos já não foi tão acentuada, podendo representar dessa forma uma degradação oxidativa.

ii) Difração de Raio X

No difratograma representado na figura 21, é possível verificar que o colágeno em pó (Cn) e a fibra de colágeno (FCn) apresentam fase cristalina, sendo que o padrão do colágeno possui picos mais estreitos o que sugere cristallitos maiores do que a fibra de colágeno, considerando também que as características físicas da amostra. Este difratograma foi comparado com alguns estudos, onde há a presença de fase cristalina para o colágeno foi caracterizada com picos mais largos, sendo que a maior intensidade foi detectada no mesmo range de 20 a 50°, esta diferença pode ser justificada devido condições da amostra, dado que nestes estudos a amostra estava em forma de gel e não em pó [106,107].

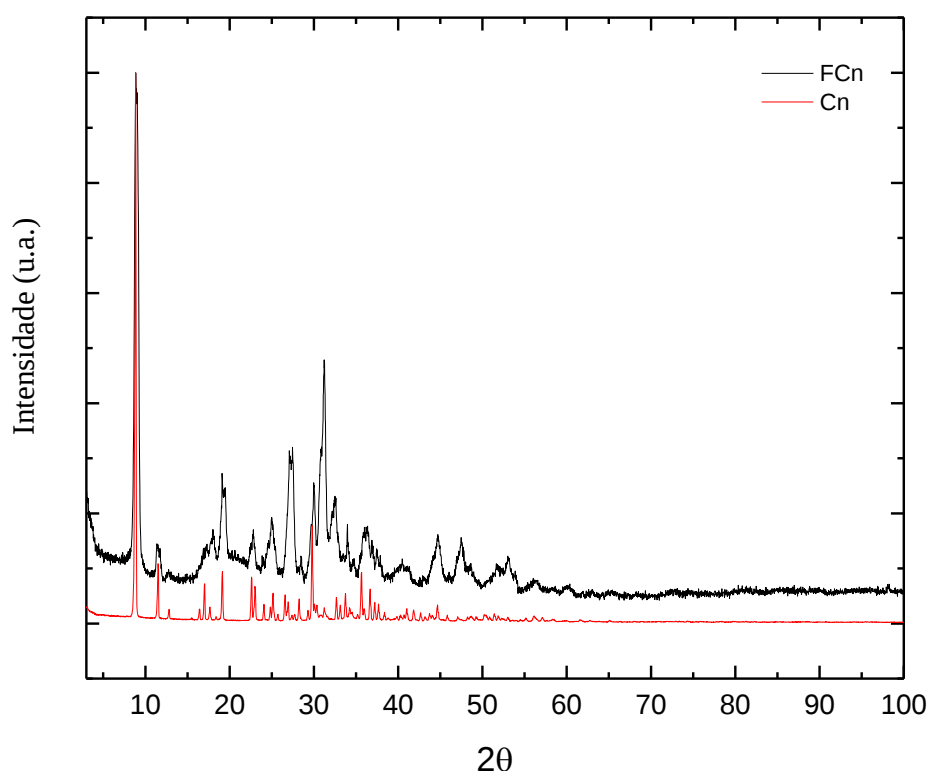


Figura 21: Difração de Raio-X do Colágeno Natural (Cn) e Fibra de Colágeno (FCn)

Fonte: Autor, 2018.

iii) Teor de Proteínas

O teor total de proteínas serve como base para identificar o percentual médio de colágeno que a amostra pode conter, no entanto, esta análise não é suficiente para mostrar como os aminoácidos estão presentes e ligados entre si, visto que estes podem variar entre hidroxiprolina e hidroxilisina, e o conteúdo total de iminoácido (prolina e hidroxiprolina).

Como produto da extração do colágeno da pele do Pirarucu, foi obtido dois materiais com características diferentes, após a liofilização. O primeiro ficou agregado na parede do frasco, como coloração branca, este produto pode ser macerado, para a obtenção de um pó fino, como se observa na Figura 22(a). O segundo produto obtido apresentou características bem distintas, e ficou entrelaçado no interior do frasco,

podendo ser quebrado manualmente, no entanto, este não é macerável, pois tem apresenta características de fibra, como se observa na Figura 22(b).

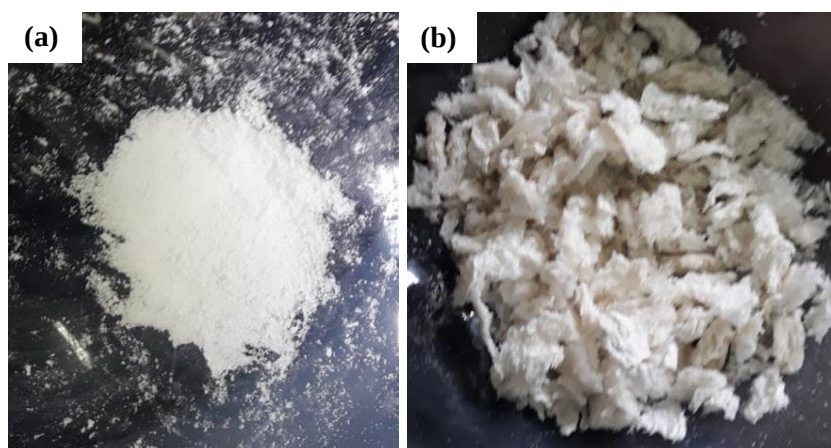


Figura 22: Materiais obtidos após a liofilização: (a) Colágeno em pó e (b) Fibra de Colágeno.

Para a formação do biocompósito através destas matérias primas, a cada 100 gramas de pele de Pirarucu, foram extraídas aproximadamente 24% em massa de fibra de colágeno (FCn) e cerca de 5% em massa de colágeno em pó (Cn), com teores de proteína de 98,10% ($\pm 0,043$) e 87,98% ($\pm 0,039$), respectivamente. O autor Prestes et. al. (2013), obteve um teor de 97,39% para a fibra de colágeno e 87,35% para o pó de colágeno hidrolisado, sendo que este também determinou a hidroxiprolina em 7,50 e 3,75%, na fibra de colágeno e no colágeno em pó, respectivamente, onde podemos inferir que provavelmente devido aos teores proteicos dos colágenos provenientes da pele do pirarucu estarem mais altos, estes podem conter maiores valores de hidroxiprolina.

Conforme já relatado pelo autor Maximo et. al. (2010), o interesse nas fibras de proteína é maior devido a sua maior concentração de proteínas, que afeta também as suas propriedades mecânicas, à capacidade de absorção da água, o potencial gelificante e estabilizante como biomaterial.

iv) Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FCn- Cn)

A análise no infravermelho está representada no espectro da figura 23, onde é possível verificar há uma diferença sutil na intensidade das bandas da amostra de colágeno (Cn) e da fibra de colágeno (FCn), tais estiramentos são similares com as literaturas consultadas, ao verificar: uma banda intensa em 3438 cm^{-1} que corresponde a banda de estiramento do OH^- ; Para identificação das proteínas, podemos destacar a banda estrutural em 1643 cm^{-1} que é atribuída a amida primária e a absorção em 1561 cm^{-1} , que corresponde a amida secundária, para a amida terciária pode se inferir o estiramento em 1011 cm^{-1} que ocorre devido as interações intermoleculares do colágeno e consiste no estiramento de C-N e N-H no plano de flexão da ligação da amida. Por fim, a banda em 2921 cm^{-1} , corresponde ao estiramento de CH^- , em vibrações simétricas e assimétricas presente nas proteínas. As bandas intensas de 800 a 1200 cm^{-1} estão relacionadas com a presença de anéis piranosídicos [109, 110,111].

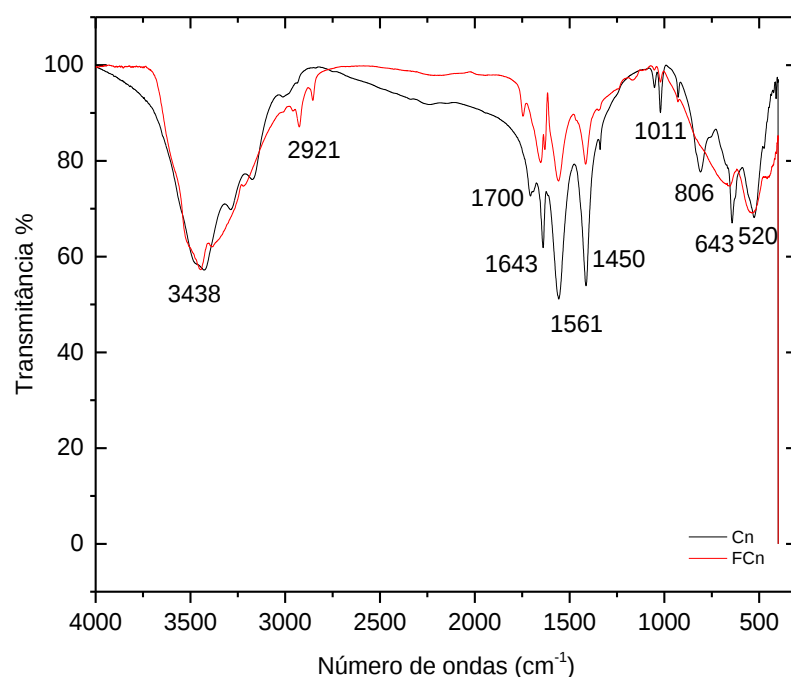


Figura 23: IR- FT Colágeno Natural (Cn) e Fibra de Colágeno (FCn)

Fonte: Autor, 2018.

O autor Santos et. al. também associou a presença de proteínas, pelas bandas características observadas em 1658 cm^{-1} , para amida primária e em 1540 cm^{-1} para amida secundária, onde a vibração detectada em 1643 e 1561 cm^{-1} , pode ser associada também a estes compostos com a diferença de que neste estudo o autor indicou uma banda em 1240 cm^{-1} , para amida terciária e nesta amostra a próxima banda característica foi em 1011 cm^{-1} .

v) Microscopia Eletrônica de Varredura- FEG Zeiss

Através do mapa FEG, representado na figura 24, é possível visualizar a distribuição dos elementos nas amostras de colágeno e fibra de colágeno respectivamente, identificando: sódio, carbono e oxigênio.

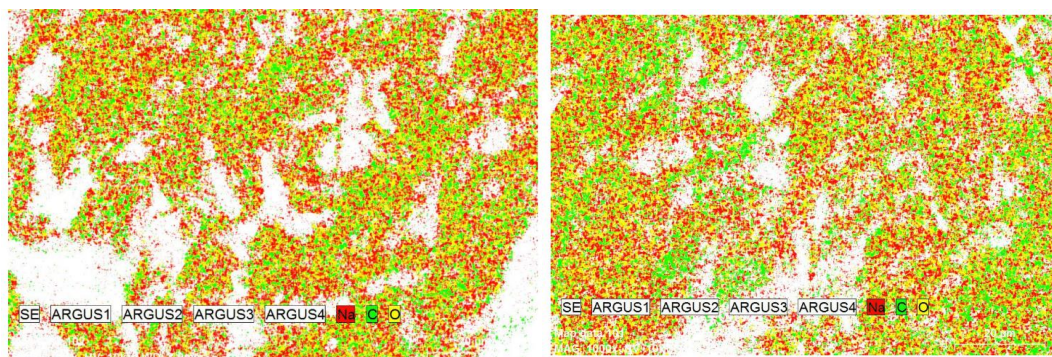


Figura 24: Mapa FEG- Colágeno Natural (Cn); e Fibra de Colágeno (FCn).

Fonte: Autor, 2018.

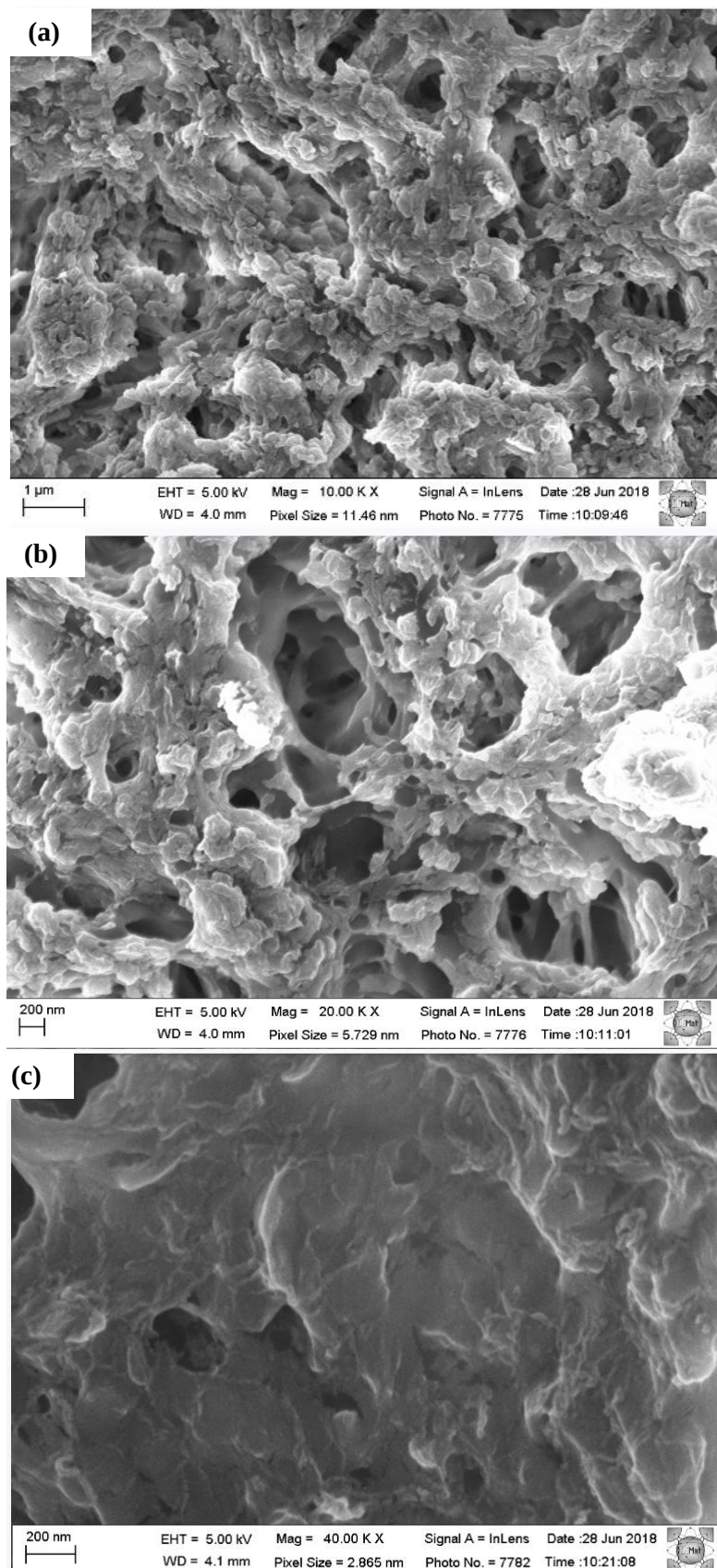


Figura 25: Micrografias-MEV do Colágeno Natural (Cn): (a) 10000X, (b) 20000X e (c) 40000X
Fonte: Autor, 2018.

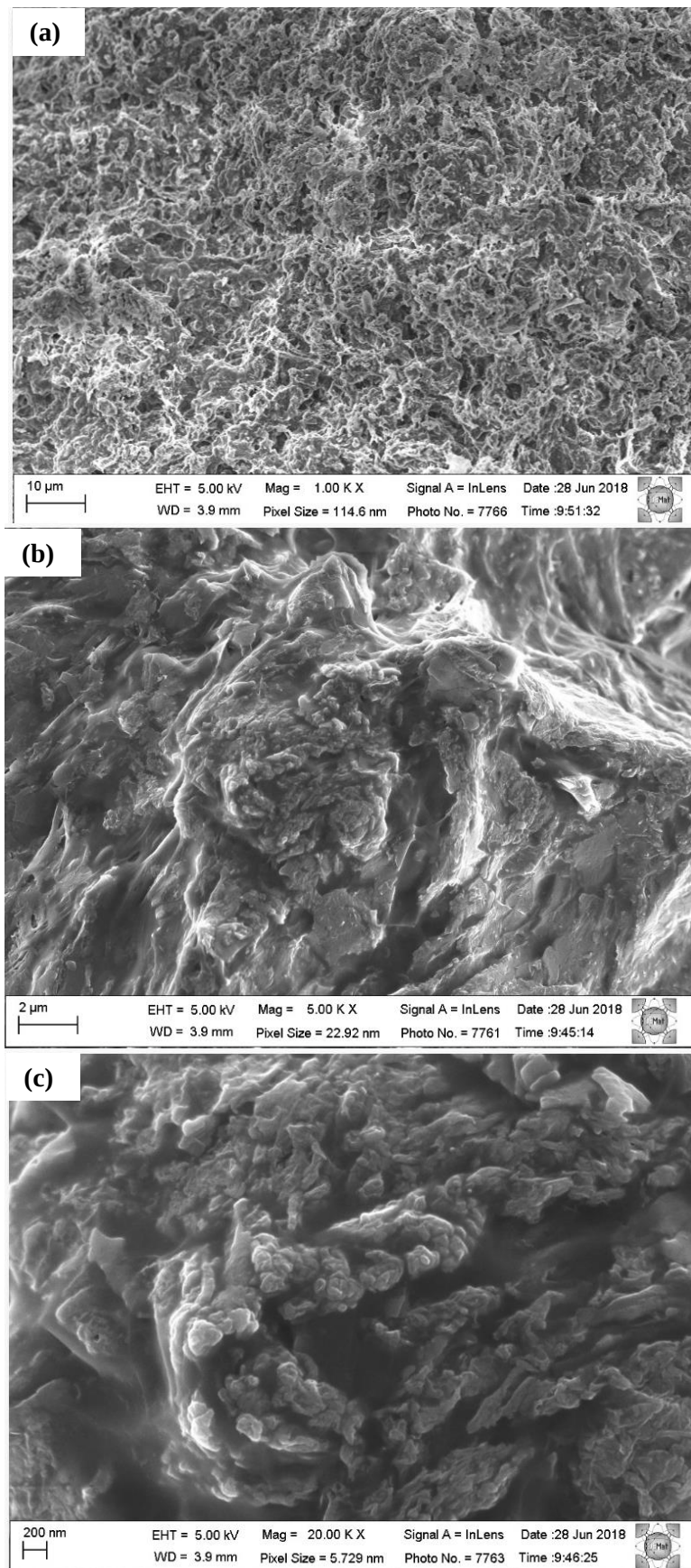


Figura 26: Micrografias-MEV da Fibra do Colágeno Natural (FCn): (a) 1000X, (b) 5000X e (c) 20000X
Fonte: Autor, 2018.

No conjunto de imagens da figura 25, tem se a microscopia eletrônica de varredura da amostra de colágeno onde é possível verificar um aglomerado reticulado, que nanometricamente, na figura 25(a) com ampliação de 10000X, figura 25(b) com ampliação de 20000X, e figura 25(c) com ampliação de 40000X possuem características de um filme com alguns poros. De acordo com Moreira (2014) e Allegretti (2009) para que as fibras apareçam em rede tridimensionais, as cargas positivas devem ser reduzidas por meio da adição de água na leitura, além de manter o colágeno em solução de ácido acético, para que assim as fibras permaneçam solúveis.

Quando comparamos a microscopia do colágeno obtido em pó da fibra de colágeno (figura 26) é evidente que a fibra possui uma aglomeração maior de proteínas, o que consequentemente dificultaria a reversão para solução em ácido acético depois de liofilizada.

vi) Análise e Metodologia BET

Para avaliar as características dos poros das nanopartículas, foi realizada uma investigação em triplicata para o colágeno em pó (Cn1, Cn2 e Cn3) e para a Fibra de Colágeno (FCn1, FCn2, FCn3) a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio pelo ensaio Brunauer-Emmett-Teller (BET), com os dados representados na Tabela 7.

Tabela 6: Características dos poros do Cn e FCn

Medida	Massa	Volume Padrão	Volume Morto	Tempo de Equilíbrio	Temperatura de adsorção	P Vapor Saturado	Área de Adsorção
Unidade	G	cm ³	cm ³	S	K	KPa	nm ²
Cn1	0.26	9.02	13.812	0	77	109.31	0.162
Cn2	0.26	9.02	13.812	0	77	109.31	0.162
Cn3	0.26	9.02	13.812	0	77	109.31	0.162
FCn1	0.21	9.02	13.85	0	77	109.33	0.162
FCn2	0.21	9.02	13.85	0	77	109.33	0.162
FCn3	0.21	9.02	13.85	0	77	109.33	0.162

Fonte: Autor, 2018.

Nesta é possível verificar que a área de adsorção é a mesma para o colágeno e para a fibra de colágeno, variando apenas em volume morto e pressão do vapor saturado que ainda não chega a ser significativos por a diferença é centesimal, viabilizando o uso de ambos materiais como matrizes de partículas nanométricas.

5.3 Obtenção do Biocompósito (HAp- FCn)

i) Biodegradabilidade

A biodegradação é um processo complexo que pode envolver três elementos principais: a presença de microrganismos, os fatores ambientais e o substrato. Neste estudo, foi avaliado os fatores ambientais, no que tange a temperatura e umidade de incubação e a presença de sais nos substratos com variação na concentração de fibra de colágeno em hidroxiapatita.

Para avaliar a perda de massa das amostras foi realizado uma pesagem inicial no tempo zero (dia), até o tempo final em 22 dias, considerando uma pesagem a cada 24 horas e triplicata das amostras nas respectivas concentrações: 15, 30 e 45%. De acordo, com a curva representada na figura 27, pode se inferir que houve uma baixa degradação das amostras, quando analisado a perda de massa em percentual, onde a variação da concentração da fibra de colágeno não interfere no comportamento de degradação, que tende a estabilização em 3,84% a partir do décimo segundo dia.

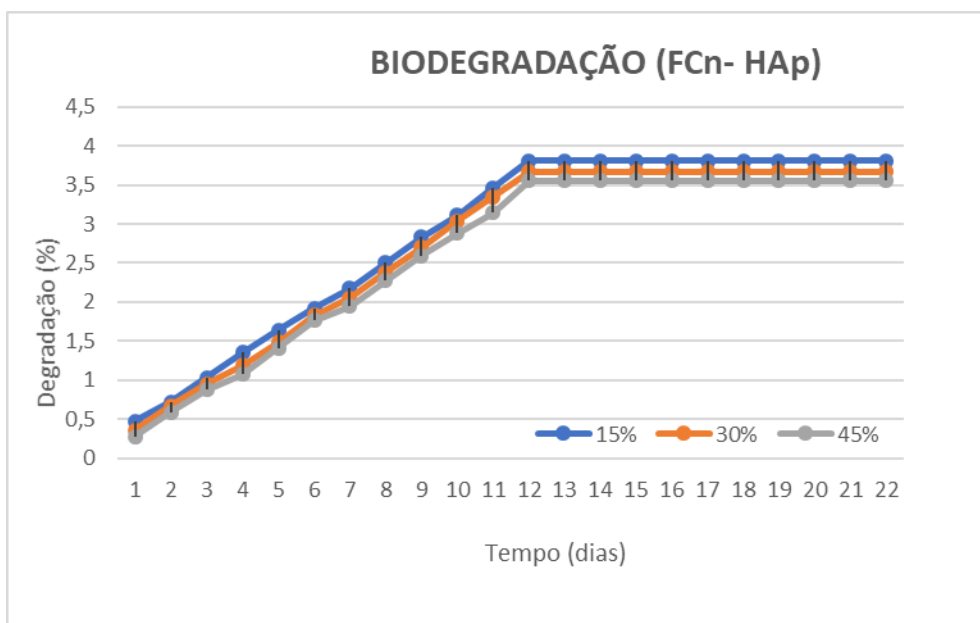


Figura 27: Curva de biodegradação do compósito formado de HAp em FCn.
Fonte: Autor, 2018.

A adição de nutrientes no meio provoca um bioestimulo, onde para este estudo os nutrientes dispostos no meio, podem não ter sido suficientes para promover a degradação total do material, o que poderia justificar a utilização de um segundo substrato ou análise em um tempo maior para detectar o tempo para degradação total.

ii) Microdureza de Vickers

De acordo com o teste mecânico para Microdureza de Vickers, foi verificado uma correlação inversa da resistência mecânica com o aumento da concentração de FCn, representado como gráfico, na figura 28. Como consequência também podemos relatar uma tendência no aumento da propriedade mecânica com o aumento da densidade do material, visto que o corpo de prova com maior densidade (15%) apresentou maior dureza 0,42 GPa.

De acordo com Cota (2015), a dureza de Vickers de biocerâmicas a base de HAp, está na faixa de 3 a 7 GPa, fato que corrobora com os resultados encontrados [115]. No entanto, Nicolazo et. al (2003), obteve valores que variam de 0,17 a 0,25 GPa, utilizando uma carga de 1 N.

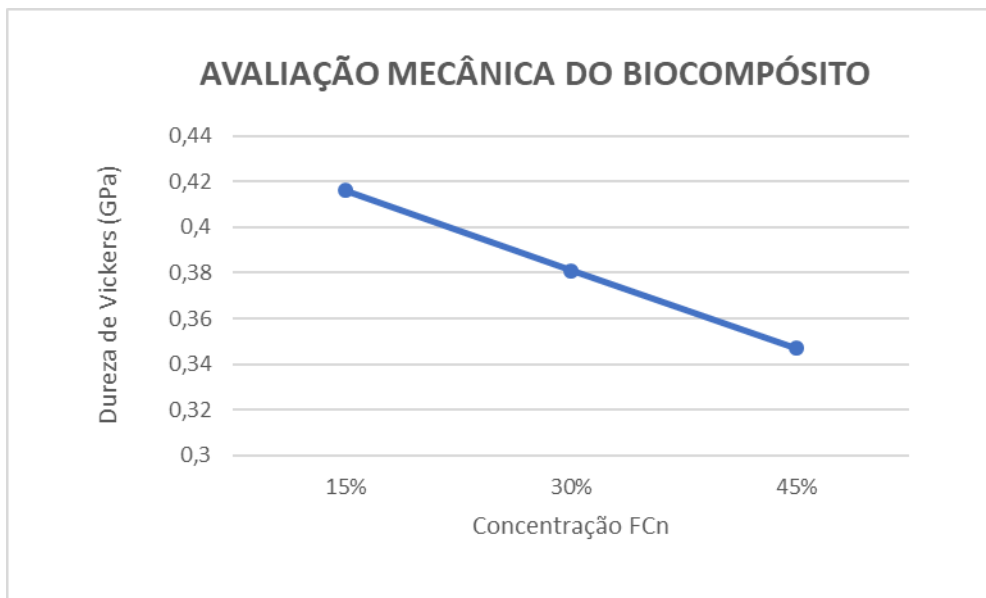


Figura 28: Gráfico de Dureza Vickers do Biocompósito em diferentes concentrações
Fonte: Autor, 2019

O estudo de Laasri et. al. (2012), utilizou peças de β -TCP, também prensadas uniaxialmente, a 60 MPa e posteriormente a 300 MPa, sinterizando a diferentes temperaturas, com resultados de dureza de Vickers variando de 0,50 a 0,90 GPa, para grãos médios de 12 μ m.

De acordo com Dorozhkin (2010), a dureza possui uma relação proporcional com o tamanho do grão até que alcance um determinado tamanho crítico, além disso em pesquisas a deste autor é e Laasri et. al (2012), é possível notar que com o aumento da temperatura de sinterização há um aumento do grão. Tal fato, não influenciou a dureza deste estudo, visto que o compósito formado não foi sinterizado após a prensagem com o objetivo de não desnaturar o colágeno.

6. CONCLUSÕES

A escama do Pirarucu é uma fonte promissora para a produção de biomateriais à base de fosfato de cálcio, e a 1000 ° C com tratamento alcalino é possível obter uma fase de hidroxiapatita estável com uma estrutura cristalina hexagonal, com razão molar de 1,5 Ca/ P. Este processo teve um rendimento médio de 47%, considerando que a maior perda ocorreu durante o tratamento térmico.

Assim como a escama, a pele do pirarucu também pode ser considerada como fonte de colágeno e fibra de colágeno, que podem ser aplicados em uma gama de materiais que variam dentre cosméticos, farmacêuticos, biomédicos e alimentício, devido a similaridade encontrada na caracterização quando comparada a outros estudos, com valores 87,98 e 98,10% e rendimento de 5 e 24%, respectivamente.

Quando avaliado ambos materiais em forma de compósito, foi visto que estes possuem boa adesão através da prensagem uniaxial, sem sinterização, ponto relevante para este estudo e que difere da maioria dos materiais formados a base de hidroxiapatita, visto que a prioridade desta pesquisa foi manter as propriedades da fibra de colágeno.

Com o teste mecânico da dureza de Vickers foi possível verificar que a fibra de colágeno pode ser utilizada para diminuir a dureza do biocompósito de acordo com a aplicação a qual se destina, não afetando os parâmetros de biodegradação nas condições estudadas, considerando a correlação do aumento da microdureza com a diminuição da fibra de colágeno, atingindo 0,42 GPa, na menor concentração testada 15%.

Apesar do estudo apresentado não contemplar testes de biocompatibilidade, como a avaliação citotóxica, a similaridade com a estrutura biológica da hidroxiapatita, da fibra de colágeno e do colágeno, conferem uma vantagem em utilizar de materiais de origem natural ao invés de materiais de origem sintética. Além de oferecer mais uma alternativa tecnológica para os resíduos do pirarucu.

Além disso, considera-se relevante para estudos futuros a investigação das condições ambientais e de suprimentos para a biodegradação total do biocompósito, ainda sim, foi notório que o colágeno e a fibra de colágeno depois de liofilizados possuem uma menor dissolução, deduzindo assim uma viabilidade para uso como matrizes em enxertos ósseos.

REFERÊNCIAS

- [1] MMA, Biodiversidade Brasileira; Ministério do Meio Ambiente, artigo disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>, com acesso em 16 de outubro de 2018;
- [2] JUNIOR, S.L.N. Desafios da Bioprospecção no Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília, janeiro de 2011.
- [3] LEVINGSTONE, T.J., Cell-free multi-layered collagen-based scaffolds demonstrate layer specific regeneration of functional osteochondral tissue in caprine joints, *Biomaterials* 87, 69 e 81, 2016.
- [4] GLEESON, J., N. Plunkett, F. O'Brien, Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration, *Eur. Cell Mater* 20, p. 218 a 230, 2010.
- [5] PARK, YS., Yi KY, Lee IS, et al: The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:31, 2005.
- [6] PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., & MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. *Química Nova*, <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>, 38 (7)/ 957–971, 2015.
- [7] LEVINGSTONE, T.J., Cell-free multi-layered collagen-based scaffolds demonstrate layer specific regeneration of functional osteochondral tissue in caprine joints, *Biomaterials* 87 / 69 e 81, 2016.
- [8] MEYERS, M. A.; LIN, Y. S., OLEVSKY, E. A., P.-Y. Battle in the Amazon: Arapaima versus Piranha- *Chen Advanced Biomaterials*; Vol.: Article first published online: DOI: 10.1002/adem.201180027; 2012.
- [9] FONTENELE, O. Contribuição ao conhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, p. 235250. (Publicação, 166), 1955.
- [10] AUTOR DESCONHECIDO, Foto retirada do site: www.guidaallapesca.it, com acesso em janeiro de 2018.
- [11] ONO, E. A.; KUBITZA, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. 2. ed. rev. ampliada. Jundiaí: F. Kubitza. 1999. 68 p.
- [12] SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/ ProVárzea. 144 p, 2006.
- [13] DIAS, N., J. O uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca. / José Dias Neto e Jacinta de Fátima Oliveira Dias. – Brasília: Ibama, 2015. 288 p. : il. Color. ; 23 cm.
- [14] NETO, L. D. A., FERREIRA, C. N. R., BEZERRA, C.H. J., PINTO, S. R. C., LEITE, B. M. MARQUES, P. H. C., FACUNDO, M. G., COSTA, M. J. “Industria do Pescado”. Apostila para Operador de Beneficiamento de Pescado UECE, PRONATEC, 2016.

- [15] CARVALHO, L. O. D. M.; NASCIMENTO, C. N. B. do. Engorda de pirarucus (*Arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos. Belém: Embrapa-CPATU, 21 p. (Circular Técnica, 65), 1992.
- [16] IMBIRIBA, E. P. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 31, n. 2, p. 299-316, 2001.
- [17] FONTENELE, O. Hábitos de desova do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Pisces: Isospondyli, Arapaimidae), e evolução da sua larva. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, 1953. 22 p. (Publicação, 153).
- [18] CRESCÊNCIO, R. Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares. 2001. 35 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 2001.
- [19] CAVERO, B. A. S. Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) em tanques-rede de pequeno volume. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 2002.
- [20] ONO, E. A.; KUBITZA, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. 2. ed. rev. ampliada. Jundiaí: F. Kubitza. 1999. 68 p.
- [21] AUTOR DESCONHECIDO, foto do site: goiasfly.blogspot.com.br, acesso em janeiro de 2018.
- [22] TAIA, 2014; <http://www.taia.com.br/peles-de-peixe-pirarucu-couros-exoticos/>; acesso em 18 de fevereiro de 2018.
- [23] EFE, Artigo publicado em 2009, com acesso disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/Mundo/0,,MUL14152545602,00COURO+DO+PIRARUCU+GANHA+ESPACO+NA+ALTA+COSTURA.html>; Acessado em fevereiro de 2018.
- [24] FILHO, S. M. M., SOUZA, W. B., RABELO, J. CLAUDINO, L. R., “Caracterização da Gelatina extraída a partir de resíduo do beneficiamento de salmão (*salmo salar*); Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca; 2016.
- [25] MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J.; TERAQ, N. Calcium phosphate cements: study of the – TCP – MCPM system. *Biomaterials*, v. 10, 475-480, 1989.
- [26] WEINAND, W. R. Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e a sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009
- [27] RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor*. In: *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press, 1996. p.1-8
- [28] SOUZA, D. C. Desenvolvimento de compósitos PEUAPM/Apatitas para substituição e regeneração óssea / Diego Clemente de Souza. - Araraquara : [s.n], 2012.
- [29] COELHO, W. T.G.; FERNANDES, J. M.; VIEIRA, R.S.; THURMER, M. B.; DOS SANTOS, L.A.; SANTOS, L.A Effect on mechanical strength of tricalcium

- phosphate cement by additions of sodium alginate. *Materials Science*, v. 727, p. 1181-1186, 2012.
- [30] VEIGA, L. G. *Biomateriais Poliméricos*. TCC (monografia). Faculdade de Tecnologia de Sorocaba. Sorocaba, 2011
- [31] PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., & MORAES, Â. M. *Biomaterials: Types, Applications, and Market*. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>, *Química Nova*, 38(7), 957–971. 2015.
- [32] PARK, YS., Yi KY, Lee IS, et al: The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:31, 2005.
- [33] AOKI, H.; *Transactions JWRI* 1988, 17, 107.
- [34] KAWACHI, E. Y., BERTRAN, C. A., DOS REIS, R. R., & ALVES, O. L. *Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar*. *Química Nova*, 23(4), 518–522. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400015> (2000).
- [35] ORÉFICE, R. L. et al. *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.
- [36] HANAWA, T. *Em The bone-biomaterial interface*; Davies, J. E., ed.; University of Toronto Press: Toronto, 1991, cap. 2.
- [37] GUASTALDI, A. C., APARECIDA, H. A. Calcium phosphates of biological interest: importance as biomaterials, properties and methods for coatings obtaining. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025>, *Quím. Nova* vol.33 no.6 São Paulo, 2010.
- [38] HENCH, Larry L., "Medical and scientific products", In: *Ceramics and Glasses*, SCHNEIDER, S.J., United States: ASM International, 1991
- [39] SMITH, W. F.; HASHEMI, J.; *Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais*, 5ª ed., McGrawHill: Porto Alegre, 2012.
- [40] HENCH, L. L.; BEST, S. M.; *Em Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine*. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds.; Academic Press: Oxford, 2013, cap. I.2.4. *Ceramics, Glasses*.
- [41] MORAES, A.; BIERHALZ, A.; PIRES, A. *Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado*. *Química Nova*, Vol 38, N° 7, 957-971, p. 15, 2015.
- [42] AKSAY, A., TRAU, M., MANNE, S., HONMA, I., YAO, N., THOU, L., FENTER, O., EISENBERGER, P.P, THOU, L., FENTER, P., EISENBERGER, P.M., GRUNER, S.M. "Biomimetic pathways for assembling inorganic thin films". *Science*, 273, 892-898; 1996.
- [43] LE GEROS, R. Z.; *In Calcium phosphates in oral biology and medicine*; Meyers; São Francisco, 1991.
- [44] BAEHR, G., DAY, J., DIESKOW, L., FAULISE, D., OVEROCKER, E., SCHWAN J. J.; *Ceramics – Windows To The Future*; Materials Science and Technology, 1995.
- [45] PARK, J. B.; LAKES, R. S. *Biomaterials an introduction*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1992. 394 p.

- [46] HANNOUCHE, DIDIER et al., Ceramics in total hip replacemet. Clin Orthop Relat Res, n. 430, p.19-26, 2003.
- [47] FARA, A.; ABDULLAH, H. Characterization of derived natural hydroxyapatite (HAp) obtained from different types of tilapia fish bones and scales. American Institute of Physics, v. 1669, n. 1, p. 1-6, 2015.
- [48] PRASAD, A.; DEVENDAR, B.; SANKAR, M. R.; ROBI, P. Micro-scratch based tribological characterization of hydroxyapatite (HAp) fabricated through fish scales. MAterialstoday: Proceedings, p. 9, 2015.
- [49] MELO, E. F. de. Biocompósitos de gelatina de pele e hidroxiapatita de escamas de resíduos do beneficiamento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará.Fortaleza, 2017.
- [50] BRUNDAVANAM, R. K. et al. Modelling the Crystal Structure of a 30 nm SizedParticle based Hydroxyapatite Powder Synthesised under the Influence of Ultrasound Irradiation from X-ray powder Diffraction Data. American Journal of Materials Science, v. 3, nº 4, p. 84-90, 2013.
- [51] CHEMTUBE, acesso em 15/01/2018
- [52] SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E.; JAMSHIDI, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta Biomaterialia, v. 9, p. 7591–7621, 2013.
- [53] TANG, M.; KRISHNAMRA, N.; THONGBUNCHOO, J.; CHAROENPHANDHU, N.; SUNTORN SARATOON, P.; PON-ON, W. (s.d.). Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. Materials Science & Engineering, v. 62, p. 183-189, 2015.
- [54] ESTEVES, A. d.; LOPES, J.; OLIVEIRA, J. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PÓS DE HIDROXIAPATITA [CA₁₀(PO₄)₆ (OH)₂] OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO SOL-GEL. Campinas: FOCO - Ano 6 - n. 8, 2015.
- [55] MUHAMMAD, N.; GAO, Y.; IQBAL, F.; AHMAD, P.; GE, R.; NISHAN, U.; ULLAH, Z. Extraction of biocompatible hydroxyapatite from fish scales using novel approach of ionic liquid pretreatment. ELSEVIER: Separation and Purification Technology, p. 7, 2015.
- [56] MORAES, Mariana Agostini de. Obtenção e caracterização de blendas e compósitos poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio. 2010. 144 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266963>; 2018.
- [57] KATTI, K. S.; Colloids Surf., B 2004, 39, 133.
- [58] CAO, W.; HENCH, L. L.; Ceram. Int. 1996, 22, 493. 132.
- [59] MONTERREY-QUINTERO, E.S. Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes. Pirassununga : USP, 1998. 83p. Dissertação de Mestrado.
- [60] SIONKOWSKA, A.; Prog. Polym. Sci. 2011, 36, 1254. 99.

- [61] SELL, A. S.; WOLFE, P. S.; GARG, K.; MCCOOL, J. M.; RODRIGUEZ, I. A.; Bowlin, G. L.; *Polymers* 2010, 2, 522
- [62] NOGUEIRA, G. M.; RODAS, A. C. D.; LEITE, C. A. P.; GILES, C.; HIGA, O. Z.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M. M.; *Bioresour. Technol.* 2010, 101, 8446
- [63] RINAUDO, M.; *Polym. Int.* 57, 397, 2008.
- [64] DAMODARAN S, PARKIN KL, FENNEMA OR. *Química de alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2010.
- [65] CAMPBELL MK. *Bioquímica*. 3. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2000.
- [66] LINDEN G, LORIENT D. *New ingredients in food processing: biochemistry and agriculture*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2000.
- [67] Schreiber R, Gareis H (2007). *Gelatin handbook*. Weinheim: Wiley-VCH GmbH and Co, 331 p.
- [68] KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. v. 23, p. 563-576, 2009.
- [69] BANDEIRA, F. S. Extração e caracterização da gelatina obtida de cabeças de carpa (*Aristichthys mobilis*). *FURG*, p. 1-19, 2009.
- [70] M. DJABOUROV, N. BONNET, H. KAPLAN, N. FAVARD, P. FAVARD, ET AL.. 3D analysis of gelatin gel networks from transmission electron microscopy imaging. *Journal de Physique II*, EDP Sciences, 1993, 3 (5), pp.611-624
- [71] KIM, S. K.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International*. v. 39, p. 383-393, 2006.
- [72] DEMAN, J.M. *Principles of food Chemistry*. Aspen: Maryland; 1999.
- [73] MONTERO, P.; FERNÁNDES-DÍAS, M. D.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. *Food Hydrocolloids*. v. 16, p. 197-205, 2002.
- [74] ARNESEN, J. A.; GILDBERG, A. Extraction of muscle proteins and gelatin from cod head. *Process Biochemistry*. v. 41, p. 697-700, 2006.
- [75] MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*. v. 18, p. 581-592, 2004a.
- [76] SCHOTT, A. Functions of gelatin in food applications. *American Association of Cereal Chemists, Inc.* v. 46, p. 414-416, 2001.
- [77] SHIMOJO, M. A.A, PEREZ, M. G. A, RODRIGUES, A.A., LANA, D. S. F. J, LUZO, M. C. A., BELANGERO, D. W., SANTANA, A. H. M. “Preparação e caracterização de complexos polietrolíticos de ácido hialurônico- quitosana para aplicação como scaffolds do plasma rico em plaquetas”. Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos. UNICAMP, 2012.
- [78] MAXIMO G. J, CUNHA R. L. Mechanical properties of collagen fiber and powder gels. *J Texture Stud.* 2010;41(6):842-62.

[79] (OLIVO, R.; GUARNIERI, P.D.; SHIMOKOMAI, M. “Fatores que influenciam na cor de files de peito de frango. Ver. N. carne, São Paulo, n.289, p. 44-49, 2001b.

[80] PRESTES, R.C. 2013. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde 15(1): 65-74.

[81] GINDL, W.; MARTINSCHITZ, K.; BOESECKE, P. KECKERS, J. Changes in the Molecular Orientation and Tensile Properties of Uniaxially Drawn Cellulose Films. Biomacromolecules, v. 7, p. 3146-3150, 2006.

[82] IGNJATOVIC, M. PLAUSIC AND D. USKOKOVIC, Advanced Engineering Materials, 2 (2000) 511- 514 Nogueira, G. M.; Rodas, A. C. D.; Leite, C. A. P.; Giles, C.; Higa, O. Z.; Polakiewicz, B.; Beppu, M. M.; Bioresour. Technol, 101, 8446; 2010.

[83] SUCHANEK, W., YOSHIMURA, M. Journal of Materials Research 13 (1998), 94 – 117. N. Ignjatovic, M. Plavsic and D. Uskokovic, Advanced Engineering Materials, 2 (2000) 511- 514.

[84] MAYA & THOMAS. Biofibers & Biocomposites. Carbohydrate Polymers, vol. 71 (3), pp.343- 364; Resultados disponíveis em <http://biobuildproject.eu/>, Projeto BioBuild, 2012.

[85] FARUK & SAIN (Editors). Biofiber Reinforcements in Composite Materials, 1st Edition, Woodhead Publishing, 772 pp., ISBN 9781782421276; 2014.

[86] PEREIRA, M. M. T. “Caracterização térmica (TG/ DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos (Estríol e Estradiol)”. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.

[87] HOLLER, F. J. Princípios de análise instrumental/ F. James Holer, Douglas A.Skoog, Stanley R.Crouch: tradução Celio Pasquini [coordenação]; Jarbas José Rodrigues Rohwedder [et.al.].- 6.ed.-Porto Alegre: Bookman,2009.

[88] JILLAVENKATESA, A.; DAPKUNAS S. J.; LUM L.H. GOETZEL, G. C. Particle Size Characterization, NIST Recommended Practice guide - Special Publication 960-1, Washington, 2001.

[89] TANG, M.; KRISHNAMRA, N.; THONGBUNCHOO, J.; CHAROENPHANDHU, N.; SUNTORNSARATOON, P.; PON-ON, W. (s.d.). Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. Materials Science & Engineering, v. 62, p. 183-189, 2015.

[90] MONTEIRO, C. R. “Definição de Propriedades mecânicas de biomateriais e materiais biológicos utilizados em odontologia via identificação instrumentada”. Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

[91] ASTM C1327-08, “Standard Test Method for Vickers Indentation Hardness of Advanced Ceramics”, This standard is a part of ASTM Book of Standards Volume 15.01, 2008.

[92] SANTOS, et. Al. Propriedades térmicas e morfológicas de filmes de gelatina obtida de resíduos de tilápia adicionados de nanocristais de celulose. Departamento de Engenharia Química. UFC-CE. 12º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013.

- [93] WONG, D.W.S. “Química de los alimentos: mecanismos y teoría”. Zaragoza: Zaragoza; 1995.
- [94] LANCELOTTI, C. Preparação e Caracterização de hidrogéis neutros de colágeno aniônico: gelatina, extrato de semente de uva. Dissertação ao Instituto de Química de São Carlos, 2014.
- [95] TORRES, M.T.L., “Síntese, caracterização e avaliação de sistemas de liberação de fármacos baseado em sílica mesoporosa para imagem em medicina nuclear”, Dissertação apresentada ao Departamento de Química, PUC- Rio, N°1012256/CB, 2012.
- [96] SAENGER, A.T.; KUHS, W.F. Structural disorder in hydroxyapatite; Zeitschrift fuer Kristallographie;199, (*) p123-p148, 1992.
- [97] FULMER, MARK & I. MARTIN, R & W. BROWN, P. (1992). Formation of Calcium Deficient Hydroxyapatite Near-Physiological Temperature. Journal of Materials Science Materials in Medicine. 3. 299-305. 10.1007/BF00705297.
- [98] DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. Journal of Materials Science, v. 44, n. 9, p. 2343-2387, 2009.
- [99] BHADANG, K. A., AND GROSS, K. A. (2004) Influence of fluorapatite on the properties of thermally sprayed hydroxyapatite coatings, Biomaterials, 25, 4935–4945.
- [100] SILVA, C. C.; ROCHA, H. H. B.; FREIRE, F. N. A.; SANTOS, M. R. P.; SABOIA, K. D. A.; GOES, J. C.; SOMBRA, A. S. B. Hydroxyapatite screen-printed thick films: optical and electrical properties. Materials Chemistry and Physics, 92, 1: 260–268, Jul. 2005.
- [101] XIA, Z.; LIAO, L.; ZHAO, S. Synthesis of mesoporous hydroxyapatite using a modified hard-templating route. Materials Research Bulletin, v. 44, n. 8, p. 1626-1629, 2009.
- [102] HAYAKAWA, S.; LI, Y.; TSURU, K.; OSAKA, A.; FUJII, E.; KAWABATA, K. Preparation of nanometer-scale rod array of hydroxyapatite crystal. Acta Biomaterialia, 5, 6: 2152-2160, Jul. 2009
- [103] GERMAN, R. M. Powder Metallurgy Science, 2nd ed., Princeton, NJ:MPIF,1994.
- [104] SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. Eclética Química: Volume 30, número 3, 2005.
- [105] SIQUEIRA, B. C. L. “Formulação e caracterização de biomateriais compósitos com hidroxiapatita”. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.
- [106] MOREIRA, F. D. C., “Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido”, Dissertação apresentada na Pós de Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas, UFMG, 2014;
- [107] ALLEGRETTI, L. J. M. Estudo da formação de fosfatos de cálcio pela mineralização de matrizes de colágeno. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

- [108] MAXIMO G. J, CUNHA R. L. Mechanical properties of collagen fiber and powder gels. *J Texture Stud.* 2010;41(6):842-62.
- [109] BALARIM, N.G.; JOB, A. E.; CABRERA, F.C.; REIS, E.A.P. Caracterização do °colágeno obtido a partir de descromagem do resíduo de couro. Universidade Estadual Paulista. 404-024, 2016.
- [110] HORN, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana , xantana e colágeno aniônico. Instituto de Química de São Carlos, 2008.
- [111] BRUNDAVANAM, R. K. et al. Modelling the Crystal Structure of a 30 nm Sized Particle based Hydroxyapatite Powder Synthesised under the Influence of Ultrasound Irradiation from X-ray powder Diffraction Data. *American Journal of Materials Science*, v. 3, nº 4, p. 84-90, 2013.
- [112] COTA, F. L. “Processamento de nanopartículas biocerâmicas de fosfato de cálcio para regeneração óssea”. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.
- [113] LAASRI, S., TAHA, M., HILL, E.K, LAGHZIZIL, A., HAJJAJI, A., “Manufacturing and mechanical properties of calcium phosphate biomaterials”, *C. R. Mecanique*, v.340, pp. 715-720, 2012.
- [114] DOROZHKIN, S.V. “Bioceramics of calcium orthophosphates”, *Biomaterias*, v. 31, pp. 1465-1485, 2010.
- [115] NICOLAZO, C., GAUTIER, H., BRANDAO, M-J., DACULSI, G., MERLE,C.,”Compactibility study of calcium phosphate biomaterials”, *Biomateriais*, v. 24, pp. 225-262, 2003.