

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS**

JÚNIOR ARTUR DOS REIS

**ANÁLISE TENSIOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MICROBIOLÓGICA
DA PELE DE TILÁPIA FRESCA E CONSERVADA EM DIFERENTES MEIOS POR
ATÉ 90 DIAS**

UBERABA-MG

2025

JÚNIOR ARTUR DOS REIS

**ANÁLISE TENSIOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MICROBIOLÓGICA
DA PELE DE TILÁPIA FRESCA E CONSERVADA EM DIFERENTES MEIOS POR
ATÉ 90 DIAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre junto ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio.

Co Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

UBERABA-MG

2025

Catalogação elaborada pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

	Reis, Júnior Artur dos.
R277a	Análise tensiométrica, histomorfométrica e microbiológica da pele de tilápia fresca e conservada em diferentes meios por até 90 dias. / Júnior Artur dos Reis. – Uberaba, 2025. 62 f. : il., color.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. Orientador: Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio. Coorientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.
	1. Histologia veterinária. 2. Pele - Fisiologia. 3. Cicatrização de ferimentos. 4. Colágeno. I. Sampaio, Renato Linhares. II. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.
	CDD 636.0891018

Tatiane da Silva Viana – Bibliotecária – CRB-6/3171

JÚNIOR ARTUR DOS REIS

ANÁLISE TENSIOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MICROBIOLÓGICA DA PELE DE
TILÁPIA FRESCA E CONSERVADA EM DIFERENTES MEIOS POR ATÉ 90 DIAS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Sanidade e
Produção Animal nos Trópicos do Programa de
Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal
nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção
Animal nos Trópicos

Aprovada em: 23/05/2025

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Guilherme Nascimento Cunha
Centro Universitário de Patos de Minas

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar seus planos acima de minhas vontades.

Aos meus pais que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra.

Aos meus amigos que ao trilharem comigo este caminho, permitindo que meus pés ficassem confortáveis e meu coração tranquilo.

Ao meu professor orientador Dr. Renato Linhares Sampaio. Que muitos outros, assim como eu, possam mergulhar na imensidão de conhecimento e sabedoria que você transmite.

Ao programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animais nos Trópicos, juntamente aos docentes do curso de medicina veterinária da Universidade de Uberaba e ao CAPES/PROSUP, agradeço pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto.

A todos que de forma direta ou indireta participaram deste projeto, cada auxílio foi fundamental na conclusão desta pesquisa.

RESUMO

Lesões cutâneas extensas requerem intervenções terapêuticas eficazes são fundamentais para promover a reparação adequada do tecido. Nesse contexto, biomembranas de origem biológica vêm sendo amplamente estudadas, destacando-se a pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) por suas propriedades estruturais, elevada concentração de colágeno, biocompatibilidade e viabilidade econômica. Contudo, é necessário volume suficiente para atender a demanda dos hospitais e clínicas humanas e veterinárias. Nesse sentido, a conservação adequada das peles de tilápias é fundamental para garantir um estoque adequado bem como preservar suas propriedades terapêuticas. Sendo assim, o primeiro capítulo desta dissertação apresenta uma revisão narrativa da literatura científica sobre o uso da pele de tilápia como biomaterial no tratamento de feridas, com foco em diferentes métodos de preservação já descritos abordando suas vantagens e desvantagens. O segundo capítulo se trata de um estudo experimental que se onde foram comparados três diferentes métodos de conservação da pele de tilápia, sendo eles: congelamento a -18 °C, imersão em glicerina a 98% e solução salina hipersaturada a 150% ao longo de 30, 60 e 90 dias. As amostras, previamente submetidas à antisepsia com clorexidina a 2%, foram avaliadas quanto à resistência mecânica em ensaios de tensão e força, estrutura morfológica por meio de coloração com Hematoxilina e Eosina, concentração de colágeno (tipos I e III) utilizando a coloração de Picrosírius Red e análise microbiológica. Os resultados demonstraram que o congelamento é eficaz para a manutenção das propriedades mecânicas por até 30 dias, enquanto a glicerina apresentou desempenho superior em 90 dias. Conclui-se que a escolha do método de preservação deve ser orientada pela duração do armazenamento desejado.

ABSTRACT

Extensive skin lesions require practical therapeutic interventions that are essential to promote adequate tissue replacement. In this context, biomembranes of biological origin have been widely studied, with tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) standing out for its structural properties, high collagen concentration, biocompatibility, and economic prospects. However, sufficient volume is required to meet the demand of human and veterinary hospitals and clinics. Therefore, proper preservation of tilapia skins is essential to ensure adequate stock and preserve their therapeutic properties. Therefore, the first chapter of this dissertation presents a narrative review of the scientific literature on the use of tilapia skin as a biomaterial in wound treatment, focusing on different preservation methods already described and addressing their advantages and disadvantages. The second chapter is an experimental study comparing three different methods of preserving tilapia skin: freezing at -18°C, immersion in 98% glycerin, and 150% hypersaturated saline for 30, 60, and 90 days. The samples, previously subjected to antisepsis with 2% chlorhexidine, were evaluated for mechanical strength in tension and strength tests, morphological structure by hematoxylin and eosin staining, collagen concentration (types I and III) using picrosirius red staining, and microbiological analysis. The results demonstrated that freezing is effective in maintaining mechanical properties for up to 30 days, while glycerin performed better at 90 days. It is concluded that the choice of preservation method should be guided by the desired storage duration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Corpo de prova em formato de ampulheta.	36
Figura 2- Corpo de prova fixado à Máquina Universal de Ensaios.	37
Figura 3 - Comparação entre as variáveis Força e Tensão para cada tipo de tratamento e seus respectivos tempos de preservação.	41
Figura 4 - Comparação entre as variáveis Força e Tensão para cada tipo de tratamento e seus respectivos tempos de preservação.	42
Figura 5 – Análise da concentração de colágenos tipo I e III presentes na pele de tilápia conservada em solução hipersaturada salina, por congelamento ou em glicerina, em períodos de 30, 60 e 90 dias.	43
Figura 6 – Análise da concentração de colágenos tipo I e III presentes na pele de tilápia fresca e nos demais meios, em períodos de 30, 60 e 90 dias.	44
Figura 7 – Concentração de colágeno tipo I e III ao longo dos períodos de 30, 60 e 90 dias.	44
Figura 8 – Análise morfométrica de pele de tilápia preservada em Solução Salina por 60 dias obtida por segmentação de cor usando o <i>software Image J</i>	44
Figura 9 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de tilápia fresca e após conservação em solução hipersaturada salina, glicerina e congelamento em período de 30 dias.	45
Figura 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de tilápia fresca e após conservação em solução hipersaturada salina, glicerina e congelamento em período de 60 dias.	46
Figura 11 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de tilápia fresca e após conservação em solução hipersaturada salina, glicerina e congelamento em período de 90 dias.	47

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS NO TRATAMENTO DAS FERIDAS	12
2.2. UTILIZAÇÃO DA PELE DE TILÁPIA COMO BIOMEMBRANA	16
2.3. MEIOS DE PRESERVAÇÃO	18
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2.....	29
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. PREPARO DAS PELES E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
2.2. AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA.....	36
2.3. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	38
2.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	38
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
3. RESULTADOS.....	40
3.1. PREPARO DAS AMOSTRAS	40
3.2. AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA.....	40
3.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	42
3.4. ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III	42
4. DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO 01 - Protocolo Comitê de Ética em Experimentação Animal.	62

CAPÍTULO 1

Título: Pele de tilápia como biomembrana na cicatrização de feridas: revisão narrativa sobre propriedades biológicas e métodos de preservação

Resumo:

A pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) tem se destacado como biomembrana promissora para o tratamento de feridas em humanos e animais, devido à sua alta concentração de colágeno, biocompatibilidade, baixa antigenicidade e viabilidade estrutural. Esta revisão narrativa tem como objetivo explorar as aplicações terapêuticas da pele de tilápia, com foco em suas propriedades histológicas, mecânicas e microbiológicas, além de discutir os principais métodos de conservação empregados para garantir sua funcionalidade clínica. Técnicas como imersão em solução de glicerina, criopreservação, liofilização, irradiação gama e solução hipersaturada de NaCl são analisadas quanto à eficácia na preservação da integridade estrutural e esterilidade do tecido. Estudos recentes demonstram que a pele de tilápia, além de acelerar a epitelização, promove angiogênese, deposição de colágeno e controle da microbiota da ferida. No entanto, a escolha do método de preservação impacta diretamente na viabilidade celular e propriedades biomecânicas do implante, sendo a padronização dessas técnicas essencial para ampliar sua aplicação clínica. A partir desta análise, destaca-se a necessidade de mais estudos comparativos que avaliem os efeitos de diferentes protocolos de conservação sobre a performance terapêutica da pele de tilápia.

Palavras-chave: Biomembrana; *oreochromis niloticus*; ferida de pele; colágeno; métodos de conservação.

**ANÁLISE TENSIOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MICROBIOLÓGICA
DA PELE DE TILÁPIA FRESCA E CONSERVADA EM DIFERENTES MEIOS POR
ATÉ 90 DIAS**

CHAPTER 1

Title: *Tilapia Skin as a Biomembrane in Wound Healing: A Narrative Review on Biological Properties and Preservation Methods and periods*

Abstract:

Tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) has emerged as a promising biomembrane for wound treatment in humans and animals due to its high collagen content, biocompatibility, low antigenicity, and structural viability. This narrative review aims to explore the therapeutic applications of tilapia skin, focusing on its histological, mechanical, and microbiological properties, as well as discussing the main preservation methods employed to ensure its clinical functionality. Techniques such as glycerolization, cryopreservation, lyophilization, gamma irradiation, and hypersaturated NaCl solution are analyzed for their effectiveness in preserving the structural integrity and sterility of the tissue. Recent studies show that tilapia skin not only accelerates epithelialization but also promotes angiogenesis, collagen deposition, and control of the wound microbiota. However, the choice of preservation method directly affects the cellular viability and biomechanical properties of the implant, making the standardization of these techniques essential for broader clinical application. Based on this analysis, the need for further comparative studies assessing the effects of different preservation protocols on the therapeutic performance of tilapia skin is highlighted.

Keywords: Biomembrane; *Oreochromis niloticus*; skin wound; collagen; conservation methods.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais extenso do corpo que com uma intrincada composição, atua, principalmente, como barreira protetora entre o corpo e o ambiente externo, protegendo-o contra danos físicos, ação de patógenos e perda de líquidos. Determinadas condições ou eventos traumáticos que tem como consequência o comprometimento da integridade da pele podendo ocasionar feridas que por sua vez desencadeiam uma série de processos que levam à reparação do tecido, a fim de recuperar sua integridade e restabelecer sua função protetora (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019). No entanto, O processo de reparação das feridas, quando sem intervenção, pode não resultar na total recuperação funcional ou estética do tecido lesado. Logo, a utilização de técnicas que auxiliem nesse processo são fundamentais para que pacientes que sofreram tal injúria consigam ter a melhor capacidade de reparação do tecido cutâneo lesionado (SU et al., 2019; REZENDE, 2018).

A literatura tem registros de outros meios de preservação utilizados para conservar membranas biológicas, como a polivinilpirrolidona, solução hipersaturada de açúcar, mel não processado, solução hipersaturada de sal, liofilização e vitrificação, (ALVARENGA, 1992; BRUN et al., 2002; CAMPBELL LH & KELVIN. 2025; JAFARI et al, 2024).

O uso de membranas biológicas se justifica, especialmente, por seu baixo custo, facilidade de obtenção, estocagem e utilização, além do simples preparo e esterilização viável, ressaltando, neste caso, a ocorrência de pouca ou nenhuma reação tecidual (ALVARENGA, 1992). Sendo que para O'Brien (2011), esta última propriedade pode ser elencada como uma chamativa vantagem, uma vez que a pouca ou nenhuma reação tecidual evita que estes implantes causem resposta inflamatória grave que possa levar o organismo a rejeitar o biomaterial implantado.

No que se diz respeito à utilização de membranas de origem biológica na reparação de feridas cutâneas, vários materiais têm sido sugeridos ao longo dos anos, como, por exemplo, o

pericárdio e pele de porco, peritônio e membrana amniótica bovinos, entre outros. Dentre os materiais investigados para este fim nas últimas décadas destaca-se a pele de tilápia, devido às suas características histológicas, mecânicas e concentração de colágeno (MATHANGI et al. 2013).

O presente capítulo tem como objetivo revisar, de forma narrativa, as evidências científicas disponíveis na literatura sobre a utilização da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como biomembrana no tratamento de feridas, destacando suas propriedades estruturais, funcionais e terapêuticas, bem como os métodos de preservação utilizados para garantir sua viabilidade como material biológico alternativo de baixo custo, com potencial de aplicação na medicina e veterinária humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS NO TRATAMENTO DAS FERIDAS

As feridas são o resultado de vários fatores e podem causar sofrimento físico e psicológico, afetando a qualidade de vida geral dos indivíduos (IBRAHIM et al., 2020a). Por se tratar de um processo dinâmico e complexo, o reparo de feridas, principalmente feridas crônicas, pode ser influenciado por diversos fatores como níveis de espécies reativas de oxigênio e atividade das células inflamatórias. Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio são capazes de induzir apoptose celular, ao passo que níveis reduzidos deste metabólito interrompem o ciclo celular resultando em atraso no processo de cicatrização (DUNNIL et al., 2015). A respeito de células inflamatórias, o recrutamento excessivo de neutrófilos para o local da lesão bem como atividade exacerbada de macrófagos do tipo M1 (pró-inflamatórios) também resultam em atraso da cicatrização (WONG et al., 2015). Essas alterações podem resultar de comorbidades frequentemente observadas como obesidade e diabetes (FADINI et al., 2016; LOUISELLE et al., 2021), além de infecções e isquemias (DAS & BAKER., 2016). Sendo assim, uma vez que cada vez mais os níveis de

comorbidades tem se elevado, e parâmetros como infecções e isquemia não são incomuns, a cicatrização ineficiente de lesões ocorre em grande escala, gerando altos gastos (DAS & BAKER, 2016).

Nesse sentido, a bioengenharia de tecidos tem se dedicado a produção de novos biomateriais que possam interagir com os sistemas biológicos, influenciando de maneira positiva nos parâmetros relacionados ao reparo de lesões como: inflamação, vascularização e oxigenação. Esses materiais têm como objetivo induzir uma resposta fisiológica adequada para uma cicatrização saudável e se possível melhorada (FESTAS et al., 2019).

Esses biomateriais são dispositivos de origem sintética, natural ou natural quimicamente modificada, os quais serão incorporados ao hospedeiro, estimulando a proliferação de novas células. Independentemente do tipo de tecido, o biomaterial ideal deve ser biocompatível, de modo em que não ocorra rejeição ou incompatibilidade imunológica e ou física do indivíduo em relação ao enxerto (O'BRIEN, 2011; CARDOSO, 2018).

Logo, o primeiro critério de qualquer enxerto ou biomaterial utilizado no auxílio da reparação de feridas é a biocompatibilidade, visto que o objetivo da engenharia de tecidos é permitir que as próprias células do corpo, ao longo do tempo, substituam o tecido implantado. Assim, biomembranas não se destinam como implantes permanentes, o que torna essencial que sejam biodegradáveis, de modo a permitir que as células produzam a sua própria matriz extracelular. Além disso, ao serem degradadas, para dar lugar ao tecido próprio do indivíduo, o biomaterial gera subprodutos que não devem ser tóxicos a fim de que não interfiram com outros órgãos (DE SOUZA et al., 2022).

Idealmente, a membrana deve ser biofuncional, ter propriedades mecânicas consistentes com o sítio anatômico no qual será implantado e, a partir de uma perspectiva prática, deve ser forte o suficiente para permitir manuseio durante a implantação, resistindo à tração, à compressão, à flexão, à fadiga, à torção e ao cisalhamento e deve apresentar resistência à

degradação em contato com fluidos orgânicos e ainda, possuir facilidade de esterilização (CARDOSO, 2018). De modo que a infiltração de células hospedeiras no local do enxerto auxilia na regeneração e remodelação do tecido, processo essencial para que o enxerto se integre funcional e estruturalmente ao tecido receptor, garantindo sucesso a longo prazo (LEAL-MARIN et al., 2021). A vascularização, por outro lado, é vital para fornecer oxigênio e nutrientes ao enxerto, suportando suas necessidades metabólicas e sua viabilidade geral (MANFREDI et al., 2021). De modo geral, um enxerto bem vascularizado apresenta melhores probabilidades de sobrevivência no ambiente receptor, ampliando sua funcionalidade e longevidade (DIAS-FERREIRA et al., 2023).

Durante o processo de preparo da biomembrana, também é necessário que ela se encontre estéril, a fim de evitar a contaminação, principalmente bacteriana, da ferida que será recoberta. Os processos de esterilização envolvem a utilização de irradiação, esterilização química, utilização de antissépticos ou gases como o óxido de etileno.

Considerando o assunto, diversos estudos abordam técnicas e materiais diferentes a fim de obter melhores e mais eficientes resultados na reparação de feridas. Dentre essas técnicas, o uso de biomateriais associados a nanopartículas vem sendo abordado, como no exemplo de estudo feito por Shafique et al. (2021) em que utilizaram uma biomembrana de hidrogel, produzida a partir de ácido hialurônico, associada a nanopartículas com antibiótico, neste caso à base de cefepima. No mesmo estudo também foi demonstrada a maior eficiência da biomembrana associada a um agente antibiótico, onde as feridas tratadas com biomembrana associada às nanopartículas com antibiótico apresentaram uma taxa de fechamento 40% maior se comparada ao grupo controle.

A associação de materiais que tenham características mecânicas e biológicas ideais também tem se mostrado promissora. Barud et al. (2013), observou *in vitro* e *in vivo*, uma relação positiva entre a diminuição do tempo de cicatrização e a utilização da membrana de

biocelulose associada à própolis em experimento com ratos da linhagem *Holtzman* (*Rattus norvegicus*),

Além disso, peptídeos também podem ser utilizados no tratamento de feridas. Horn e Neundorf (2018), avaliaram pela primeira vez as atividades biológicas de peptídeos quiméricos curtos sintetizados artificialmente. Os testes *in vitro* que avaliaram desde citotoxicidade até a internalização mostraram a capacidade desses peptídeos penetrarem em queratinócitos, resultando na maior migração e proliferação desses no local da ferida.

Outro fator que influencia na qualidade da membrana que recobre a ferida é a permeabilidade. As membranas assimétricas, que apresentam camada externa mais densa para proteção mecânica e camada interna porosa. são desenvolvidas justamente com esse enfoque, visto que apresentam porosidade necessária para permitir a eliminação de exsudato, além de impedir a desidratação e a entrada de bactérias na ferida (MIGUEL et al, 2019). Assim como diferentes tamanhos de fibras, seu diâmetro, densidade, conformação e porosidade influenciam na eficiência da reparação tecidual. Nesse contexto, Wang et al. (2022) testaram diferentes diâmetros de fibra que variaram de 300 a 1000 nm e mostraram que o menor diâmetro favorece a reparação da ferida, por apresentar mais força mecânica e melhores características hidrofilicas.

Dentre os biomateriais atualmente pesquisados para o tratamento das feridas, podemos citar os materiais orgânicos naturais bioativos, originários de produtos aquáticos, visto que o colágeno derivado de escamas, pele e ossos de peixes, tem sido de grande interesse para laboratórios em todo o mundo, pelo seu potencial de aplicação como biomaterial e veículo de suporte, devido às suas propriedades de bioatividade, com excelente biocompatibilidade, baixa antigenicidade e alta biodegradabilidade e potencial de proliferação celular (LIMA-JUNIOR et al., 2020).

2.2. UTILIZAÇÃO DA PELE DE TILÁPIA COMO BIOMEMBRANA

Uma grande diversidade de materiais são utilizados no tratamento de feridas, e uma característica comum entre eles é a importância do colágeno nessas biomembranas (MEYER, 2019). Tal importância se deve a seu papel como proteína de manutenção estrutural de grande abundância em todos os animais, logo, biomateriais que contenham esta proteína e que sejam biocompatíveis são amplamente utilizados em estudos sobre o tratamento de feridas, como exemplo da pele de tilápia (DE SOUZA et al., 2022; FATEMI et al., 2021).

Com ampla distribuição geográfica, a produção de tilápia vem crescendo de forma consistente com o passar dos anos, sendo atualmente a espécie de peixe mais cultivada pela piscicultura brasileira, tornando a pele de tilápia um produto de fácil acesso e de baixo custo. Em 2022 houve aumento da produção em 3%, o que representou 550.060 toneladas, cerca de 63,93% da produção nacional de peixes de cultivo, mantendo o Brasil em quarto lugar no ranking mundial de produtores de tilápia (PSICULTURA, 2023)

A pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um produto nobre e de alta qualidade, pois possui resistência peculiar (ALVES et al., 2015), além de 25% de colágeno em sua constituição, sendo comparável aos níveis de colágeno normalmente observados na pele de mamíferos (30%) (KARIM, BHAT; 2009). Contudo, em um estudo recente, Huang et al. (2024) demonstraram que o colágeno derivado da pele de tilápia apresentou potencial superior para permitir a migração, adesão e proliferação de fibroblastos derivados da pele humana quando comparado aos colágenos bovino e suíno.

Além disso, a pele de tilápia vem sendo utilizada como biomembrana, conforme casos clínicos relatados que demonstram o sucesso nas aplicações medicinais de pele de tilápia como curativo oclusivo em tratamento de queimaduras tanto em humanos quanto em animais. Neste tipo de ferida, a indicação do uso é viável em função da elevada concentração de colágenos tipos 1 e 3, por ser altamente úmida e por possuir diversas substâncias na pele que aceleram a

cicatrização do epitélio. Além disso, neste biomaterial encontra-se o ômega 3, óleo responsável por diminuir os fatores inflamatórios e aspectos necróticos da ferida causados pela alta temperatura (AIUB; PASSINI, 2019; LIMA-JUNIOR et al., 2019; LIMA-JUNIOR et al., 2020; COSTA, 2022).

Na medicina veterinaria há relatos da utilização de pele de tilápia como curativo oclusivo e como xenoenxerto em feridas de diversas naturezas e em várias espécies diferentes, como reparação de feridas crônicas em equinos, tratamento de lesões cutâneas traumáticas em cães e gatos, e ainda, em regiões com menor suporte sanguíneo, como a córnea (ELBIALY *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2022).

As vantagens da utilização da pele de tilápia foram demonstradas também na aceleração da reepitelização de feridas em animais. Ibrahim et al. (2020), utilizou dessa biomembrana no tratamento de equinos com feridas cirurgicamente induzidas, na região do metacarpo. Os animais foram então divididos em grupo controle e tratado, sendo que o grupo tratado teve a região da ferida recoberta por pele de tilápia devidamente esterilizada. Os dois grupos foram observados durante 21 dias e quando comparadas, as feridas dos animais tratados com a pele de tilápia apresentaram, além de mais rápida reepitelização, maior formação de novos vasos e maior deposição de colágeno, além de diminuição de atividade microbiana (IBRAHIM *et al.*, 2020).

Faraji et al. (2022) utilizaram pele de tilápia no tratamento de área de necrose de um neonato que apresentou lesão no braço esquerdo devido ao extravasamento de medicações em acesso venoso periférico. A pele de tilápia foi mantida sobre a lesão por 10 dias e em duas semanas havia redução significativa da área acometida e melhora no aspecto geral da lesão. Os autores relataram a cicatrização completa das lesões em 30 dias, destacando a redução do período de cicatrização tecidual e ausência de infecção, o que salienta mais um aspecto positivo da utilização dessa biomembrana.

Na medicina veterinaria há relatos da utilização de pele de tilápia como curativo oclusivo e como xenoenxerto em várias espécies diferentes. Assim como em humanos, seu uso pioneiro foi no tratamento de feridas causadas por queimaduras. Feridas de diversas naturezas também apresentaram resultado significativo com o uso da técnica, como reparação de feridas crônicas em equinos, tratamento de lesões cutâneas traumáticas em cães e gatos, e ainda, em regiões com menor suporte sanguíneo, como a córnea (ELBIALY et al., 2020; IBRAHIM et al., 2020c; MELO et al., 2022).

No entanto, mesmo que o biomaterial seja adequado, é necessário volume suficiente para atender a necessidade dos hospitais e clínicas humanas e veterinárias. E para garantir disponibilidade confiável de biomembranas é essencial um banco de tecidos onde seja feita de maneira adequada a conservação dessas biomembranas. Vários métodos tem sido propostos para a conservação das peles de tilápia, como congelamento, secagem (MORAES-FILHO, 2018), criopreservação ou liofilização (MIRANDA; BRANDT, 2019; IBRAHIM et al., 2020) e a irradiação de raios gama (DELGADO et al., 2014; DAI et al., 2016). A maioria dos métodos de conservação tem como objetivo eliminar a contaminação, mantendo a viabilidade das células. Esses meios de conservação influenciam diretamente na composição celular a qual é fundamental para o resultado no paciente (LIMA-JUNIOR et al., 2020; KOHLHAUSER et al., 2021; NIE et al., 2022).

2.3. MEIOS DE PRESERVAÇÃO

Diferentes técnicas para preservação de tecidos têm suas próprias vantagens e desvantagens, exemplo disso é observado entre a criopreservação e a glicerina 85%, que como demonstrado em revisão de Hermans (2011) podem levar a diferenças no crescimento bacteriano de tecidos preservados; como em glicerina, que reduziu a zero o crescimento bacteriano, que antes era presente em 10% das amostras e na criopreservação que já mostrou indícios de ser passível para auxiliar na transmissão de patógenos como HIV (CLARKE, 1987;

VERBEKEN et al., 2009). Ainda assim, os dados coletados nos estudos são muito diversos para permitir uma verdadeira comparação científica ou análise estatística. Isto é particularmente surpreendente em vista das convicções existentes sobre a superioridade entre uma técnica de preservação e outra.

A glicerina e a criopreservação são utilizados como métodos de armazenamento e preservação (LIMA-JUNIOR et al., 2020). A glicerina é um composto orgânico higroscópico, ou seja, possui alta capacidade de absorver água. Sendo assim, na conservação com glicerina ocorre desidratação das células (KARAM et al., 2016). A glicerina a 98% desidrata o tecido e remove a maior parte da água intracelular, contudo, isso é facilmente revertido após reidratação do tecido, o que o torna um eficaz fixador e protetor da integridade celular (JUSTINO, 2021). Alves et al. (2018), observaram em seus estudos que a pele de tilápia submetida a este protocolo, mesmo após a reidratação a pele é histologicamente semelhante à pele de tilápia *in natura*, apresentando uma pequena desorganização nas fibras colágenas, mas com reduzida significância clínica.

Outras vantagens da conservação com glicerina incluem: baixo custo, efeitos antivirais e antibacterianos, produzindo um material biológico menos antigênico, permitindo uma conservação duradoura (LIMA-JUNIOR et al., 2020). Para reduzir as chances de rejeição, as biomembranas devem permanecer preservadas, por período mínimo de 30 dias, em glicerina. Conclui-se que principalmente por garantir a preservação da estrutura histológica, conservação ou aumento da resistência a tração, a glicerina em diferentes composições ainda é utilizada como meio para a preservação de biomembranas para usos clínicos (GHOLIPOURMALEKABADI et al., 2020).

Mesmo com resultados satisfatórios em relação a estes meios de preservação, principalmente a glicerina, estudos são desenvolvidos na tentativa de encontrar meios alternativos de preservação para biomembranas.

Como um dos métodos de preservação, a criopreservação de tecidos e até mesmo de órgãos inteiros tem sido cada vez mais utilizada e armazenada em bancos em todo o mundo (ARUTYUNYAN et al., 2010). Sabe-se que o congelamento de células leva à expansão do conteúdo intracelular, gerando cristais, o que por sua vez acarreta em rompimento da membrana e morte celular (HERRERO-GÓMEZ et al., 2022). Além disso, o armazenamento em refrigeradores criogênicos ou ultrafrios, em temperatura mínima de -80º pode alterar a estrutura da pele e consequentemente reduzir sua viabilidade (LING et al., 2023) . A estrutura das biomembranas é de extrema importância pois influencia diretamente em sua interação *in vivo*, afetando o comportamento celular (BADYLAK, et al., 2009). Dessa forma, a preservação da morfologia é algo desejável durante o processo de preservação. Sendo assim, o congelamento em temperaturas que chegam a -80º C pode não ser adequado. Porém, a literatura carece de estudos que abordam os efeitos do congelamento de biomembranas em temperaturas mais elevadas (até - 20º C), resultando em uma nova e possível metodologia de preservação a ser investigada.

Outro método de conservação é a solução hipersaturada do sal NaCl. Essa solução, quando preparada na concentração de 1,5g de sal para 1mL (150%) de água tridestilada, além de preservar a maleabilidade do tecido, possui propriedades antissépticas que inibem o crescimento de bactérias e fungos (BRUN et al., 2002). A solução hipersaturada de NaCl demonstrou ser eficaz para preservar cérebros de ratos *Wistar* por quatro semanas sem alterações em suas estruturas macroscópicas (MARTINS-COSTA et al., 2022). De modo semelhante, a solução salina a uma concentração de 26% demonstrou ser eficiente em preservar as estruturas macroscópicas de amostras de cérebro e fígado humano por até 56 dias (JUMLONGKUL, TRAITHEPCHANAPAI; 2017). Biomembranas compostas por centros frênicos caninos preservados em solução saturada de NaCl por 90 dias foram eficazes para reparar lesões no músculo reto abdominal em ratos *Wistar*, sugerindo que a metodologia é

eficaz para preservar as estruturas do tecido. Entretanto, no que diz respeito a estrutura microscópica, um estudo de preservação utilizando pericárdio demonstrou que a solução hipersaturada de sal pode promover o desarranjo estrutural e desencadear processo de autólise do tecido conjuntivo (BARIANI JÚNIOR et al., 2014), o que não é desejável, uma vez que as propriedades da biomembrana estão relacionadas diretamente à sua composição e estrutura (BADYLAK et al., 2009), de modo que os resultados de sua utilização clínica podem não ser eficazes. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento da concentração do meio extracelular, que resulta em fluxo das moléculas de água pela membrana plasmática de modo que seja atingido o equilíbrio osmótico, ou seja, equivalência das concentrações intra e extracelular. Contudo, o influxo excessivo induz aumento excessivo do líquido intracelular resultado em rompimento da membrana plasmática (FINAN, GUILAK, 2009). O conteúdo celular, ao ser liberado na matriz de tecido conjuntivo pode acarretar em lise tecidual. Portanto, apesar de seu baixo custo e eficácia, a solução hipersaturada de NaCl deve ser melhor investigada principalmente no que diz respeito ao seu impacto na morfologia da biomembrana.

A irradiação de diferentes tipos de energia e tratamentos físicos similares vem despondo como uma maneira simples, e capaz de evitar a citotoxicidade ocasional que pode ser gerada em tratamentos químicos (DELGADO et al., 2014).

A irradiação de energia gama vem sendo utilizada como método de preservação, e principalmente tratamento de esterilização de biomembranas. Esse tipo de radiação quebra as fitas de DNA e RNA, gerando espécies reativas de oxigênio que danificam os componentes celulares podendo inativar vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, vírus e alguns esporos bacterianos, sendo então uma maneira efetiva de esterilizar biomembranas. Em contrapartida, a irradiação gama pode ocasionar mudanças nas propriedades do material tratado, podendo, por exemplo, reduzir a resistência mecânica, alterar características químicas e aumentando as taxas de degradação após a esterilização (DAI et al., 2016). Observou-se que

de modo geral, métodos físicos como a irradiação por feixe eletrônico têm como maior limitação a mudança das propriedades estruturais de dispositivos à base de colágeno, reduzindo a resistência e aumentando as taxas de degradação. Radioprotetores, como a L-cisteína, podem ser usados para reduzir os danos causados pela radiação e melhorar a integridade do dispositivo. A esterilização por plasma gasoso pode esterilizar com eficácia vários tipos de suturas sem alterar as propriedades mecânicas, mas sua influência nas propriedades mecânicas dos dispositivos à base de colágeno requer um estudo mais aprofundado (DELGADO et al., 2014).

CONCLUSÃO

Estudos experimentais e relatos clínicos demonstram a eficácia do uso da pele de tilápia em diferentes tipos de feridas, promovendo aceleração do processo cicatricial, redução da atividade microbiana e melhora na vascularização local. A pele de tilápia tem se destacado como um biomaterial promissor no tratamento de feridas, devido às suas propriedades biológicas, estruturais e funcionais que favorecem a regeneração tecidual. A elevada concentração de colágeno, a biocompatibilidade, a resistência mecânica e a presença de substâncias bioativas, como o ômega 3, conferem à pele de tilápia características ideais para seu uso como biomembrana, tanto na medicina humana quanto veterinária. Além disso, sua ampla disponibilidade e baixo custo tornam sua aplicação ainda mais atrativa, especialmente em contextos com recursos limitados.

Os avanços nas técnicas de conservação, como a liofilização, criopreservação e irradiação, têm contribuído para a viabilização do armazenamento e da disponibilidade deste biomaterial, permitindo sua utilização em larga escala. Dessa forma, a pele de tilápia representa uma alternativa viável e eficaz às membranas biológicas convencionais, sendo um recurso inovador e sustentável na área da bioengenharia de tecidos aplicados à cicatrização de feridas.

No entanto, mais estudos são necessários para padronizar os protocolos de preparo, conservação e aplicação clínica, a fim de consolidar seu uso rotineiro com segurança e eficácia comprovadas.

REFERÊNCIAS

- AIUB PB & PASSINI Y. 2019. Uso de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em acidentes por queimadura em animais selvagens. B Apamvet. 29–31
- ALVARENGA, J. 1992 Possibilidades e limitacoes da utilizacao de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: Daleck, CR., Baptista, L.C. and Mukai, L.S., Eds., Tópicos em cirurgia de caes e gatos, Funep-Unesp, Jaboticabal, 33-42.
- ALVES A, et al. 2015. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. Rev Bras Queimaduras 14(3): 203–10
- ALVES APNN, et al. 2018. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. Cell Tissue Bank 19(3): 373–82.
- ARUTYUNYAN I, ELCHANINOV A, SUKHIKH G & FATKHUDINOV T. 2021. Cryopreservation of Tissue-Engineered Scaffold-Based Constructs: From Concept to Reality. Stem Cell Rev Rep 18(4): 1234–1252.
- BADYLAK S, FREYTES D & GILBERT T. 2009. Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function. Acta Biomater 5(1): 1–13.
- BARIANI F, LOPES GC, CRISCI AR, JUNIOR RF, SOUZA C & GREGÓRIO CORRÊA GUIMARÃES. 2014. Análise morfológica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em açúcar, glicerina, mel e sal. Vet Notícias 20(2).
- BARUD HS, et al. 2013. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. J Evid Based Complementary Altern Med eCAM 2013: 703024.
- BRUN MV, PIPPI NL, DREIMEIER D, CONTESINI EA, BECK CA de C, CUNHA O da, PINTO FILHO STL, ROEHSIG C & STEDILE R. 2002. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. Ciência Rural 32(6): 1019–1025.

- BRUN MV, et al. 2004. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. Ciência Rural 34(1): 147–153.
- CAÑEDO-DORANTES L & CAÑEDO-AYALA M. 2019. Skin acute wound healing: A comprehensive review. Int J Inflamm. 2019: 1–15
- CARDOSO LD. 2018. Avaliação histológica de cartilagens elásticas submetidas a diferentes processos de conservação e tratamento alcalino. Biociêncie animal.
- CLARKE JA. 1987. HIV transmission and skin grafts. Lancet. 329(8539): 983.
- COSTA JQ. 2022. Tratamento de ferida aberta em cães com o uso de curativo biológico com pele de tilápia. Trabalho de conclusão de curso (Monografia em Medicina Veterinária) - Medicina Veterinária do Instituto Federal da Paraíba, Instituto Federal da Paraíba. Paraíba.
- DAI Z, RONHOLM J, TIAN Y, SETHI B & CAO X. 2016. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. J Tissue Eng 7: 1–13.
- DAS S & BAKER A. 2016. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. Front Bioeng Biotechnol 4 (82).
- DE SOUZA A, DE ALMEIDA CRUZ M, DE ARAÚJO TAT, PARISI JR, DO VALE GCA, DOS SANTOS JORGE SOUSA K, RIBEIRO DA, GRANITO RN & RENNO ACM. 2022. Fish collagen for skin wound healing: A systematic review in experimental animal studies. Cell Tissue Res 388(3): 489–502.
- DELGADO LM, PANDIT A & ZEUGOLIS DI. 2014. Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties. Expert Rev Med Devices 11(3):305–14.
- DIAS-FERREIRA J, TEIXEIRA MC, SEVERINO P, BOONME P, JOVANOVIC J, ZIELIŃSKA A & SOUTO EB. 2023. Applications of biomaterials in wound healing management: from fundamental physiology to advanced technology. Nanotech Reg Med Elsevier 349–369.
- DUNNILL C, PATTON T, BRENNAN J, BARRETT J, DRYDEN M, COOKE J, LEAPER D, GEORGOPoulos NT. 2015. Reactive Oxygen Species (ROS) and Wound Healing: The Functional Role of ROS and Emerging ROS-Modulating Technologies for Augmentation of the Healing Process. Int Wound J 14(1): 89–96.

- ELBIALY ZI, ATIBA A, ABDELNABY A, AL-HAWARY II, ELSHESHTAWY A, EL-SEREHY HA, ABDEL-DAIM MM, FADL SE & ASSAR DH. 2020. Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin accelerates wound healing in rat model via upregulating VEGF, bFGF, and α -SMA genes expression. *BMC Vet Res* 16(1): 352.
- FADINI GP, et al. 2016. NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans. *Diabetes* 65(4): 1061–1071.
- FARAJI N, GOLI R, GHALANDARI M, TAGHAVINIA S, MALKARI B & ABBASZADEH R. 2022. Treatment of severe extravasation injury in a newborn by using tilapia fish skin: A case report. *Int J Surg Case Rep* 91: 106759.
- FATEMI MJ, GARAHGHESHLAGH SN, GHADIMI T, JAMILI S, NOURANI MR, SHARIFI AM, SABERI M, AMINI N, SARMADI VH & YAZDI-AMIRKHIZ SY. 2021. Investigating the Impact of collagen-chitosan derived from *Scomberomorus Guttatus* and shrimp skin on second-degree burn in rats model. *Regen Ther* 18: 12–20.
- FESTAS AJ, RAMOS a & DAVIM JP. 2019. Medical Devices Biomaterials – a Review. *Proc Inst Mech Eng* 234(1): 218–228.
- FINAN JD & GUILARK F. 2009. The Effects of Osmotic Stress on the Structure and Function of the Cell Nucleus. *J Cell Biochem* 109: 460-467.
- GHOLIPOURMALEKABADI M, FARHADIHOSSEINABADI B, FARAJI M & NOURANI MR. 2019. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns Sep* 46(6): 1254-1271.
- HERMANS MHE. 2011. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. *Burns* 37(5): 873–81.
- HERRERO-GÓMEZ A, AZAGRA M & MARCO-RIUS I. 2022. A Cryopreservation Method for Bioengineered 3D Cell Culture Models. *J Biomed Mat* 17(4): 045023–045023.
- HORN M & NEUNDORF I. 2018. Design of a novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing. *Sci Rep* 8(1): 1–12.
- HUANG JY, WONG TY, TU TY, TANG MJ, LIN HH & HSUEH YY. 2024. Assessment of Tilapia Skin Collagen for Biomedical Research Applications in Comparison with Mammalian Collagen. *Molecules* 29(2): 402.

- IBRAHIM A, HASSAN D, KELANY N, KOTB S & SOLIMAN M. 2020. Validation of three different sterilization methods of tilapia skin dressing: Impact on microbiological enumeration and collagen content. *Front Vet Sci.* 7: 1–8.
- JUMLONGKUL J & TRAITHEPCHANAPAI P, 2017. Comparison between Formaldehyde and Salt Solutions for Preservation of Human Liver and Brain Slices. *Chula Med J* 61(1): 17–30.
- JUSTINO MA. 2021. Extração e caracterização de colágeno de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*): avaliação do seu potencial na formulação de hidrogéis para medicina regenerativa. *Mar Drugs* 1(3): 115.
- KARAM RG, CURY FS, AMBRÓSIO CE & MANÇANARES CAF. 2016. Uso Da Glicerina Para a Substituição Do Formaldeído Na Conservação de Peças Anatômicas. *Pesq Vet Bras* 36(7): 671–675.
- KARIM AA & BHAT R. 2009. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll* 23(3): 563–76.
- KOHLHAUSER M, LUZE H, NISCHWITZ SP & KAMOLZ LP. 2021. Historical evolution of skin grafting—A journey through time. *Medicina* 57(4): 348.
- LEAL-MARIN S, KERN T, HOFMANN N, POGOZHYKH O, FRAMME C, BÖRGEL M, FIGUEIREDO C, GLASMACHER B & GRYSHKOV O. 2021. Human amniotic membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 109(8): 1198–215.
- LIMA-JUNIOR EM, DE MORAES FILHO MO, COSTA BA, FECHINE FV, DE MORAES MEA, SILVA-JUNIOR FR, SOARES MFADN, ROCHA MBS & LEONTSINIS CMP. 2019. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. *J Surg Case Rep.* 2019(6): 1–5.
- LIMA-JÚNIOR EM, et al. 2020. Lyophilised tilapia skin as a xenograft for superficial partial thickness burns: a novel preparation and storage technique. *J Wound Care* 29(10): 598–602.
- LIN H, ZHANG D, ALEXANDER PG, YANG G, TAN J, CHENG AW & TUAN RS. 2013. Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture. *Biomaterials* 34(2): 331–9.

- LING J, DU Y, SHENG Y, WANG W, WU H, CHEN G & LV H. 2023. Influence of Cryopreservation Methods of Ex Vivo Rat and Pig Skin on the Results of in Vitro Permeation Test. *Eur J Pharm Biopharm* 189: 109–121,
- LOUISELLE AE, NIEMIEC SM, ZGHEIB C & LIECHTY KW. 2021. Macrophage Polarization and Diabetic Wound Healing. *Transl Res* 236: 109–116.
- MANFREDI GG do P, CARDOSO MV, STUANI V de T, FERREIRA R, ZANGRANDO MSR, DAMANTE CA, FILHO MO de M, ALVES APNN, JÚNIOR EML & SANT'ANA ACP. 2021. The use of Nile Tilapia skin as an occlusive biological dressing for palatal wound healing: A case series. *Res Soc Dev* 10(8): e24010817146.
- MARTINS-COSTA C, NUNES TC & ANJOS-RAMOS LD. 2022. Anatomo-Comparative Study of Formaldehyde, Alcohol, and Saturated Salt Solution as Fixatives in Wistar Rat Brains. *Anat Hist Embr* 51(6): 740–745.
- MATHANGI RAMAKRISHNAN K, BABU M, MATHIVANAN, JAYARAMAN V & SHANKAR J. 2013. Advantages of collagen based biological dressings in the management of superficial and superficial partial thickness burns in children. *Ann Burns Fire Disasters* 26(2): 98–104.
- MELO M de S, VIEIRA-NETO AE, WOUK AFP de F, EVANGELISTA JSAM, MORAIS GB de, MORAES MEA de & FILHO MO de M. 2022. Enxerto de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em reparo de úlcera em córnea de cão: relato de caso / Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin graft in dog corneal ulcer repair: case report. *Braz J Anim Environ Res* 5(1): 367–75.
- MEYER M. 2019. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMed Eng Online* [S. l.] 18(1): 174.
- MIGUEL SP, MOREIRA AF & CORREIA IJ. 2019. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *Int J Biol Macromol*. 127: 460–75.
- MIRANDA MJB & BRANDT CT. 2019. Nile tilapia skin xenograft versus silver-based hydrofiber dressing in the treatment of second-degree burns in adults. *Rev Bras Cir Plast (RBCP)* 34 (1): 89–95.
- NIE Y, CHEN J, XU J, ZHANG Y, YANG M, YANG L, WANG X & ZHONG J. 2022. Vacuum freeze-drying of tilapia skin affects the properties of skin and extracted gelatins. *Food*

Chem 374: 131784.

MORAES-FILHO EML-J, PICOLLO NS, MIRANDA MJB de, RIBEIRO WLC, ALVES APNN, FERREIRA GE, PARENTE EA & ODORICO M. 2018. Viabilidade da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico no tratamento de queimaduras. Anais da Faculdade de Medicina de Olinda 1(1): 49–52.

O'BRIEN FJ. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater Today 14(3): 88–95.

PSICULTURA AB. 2023 - PeixeBR. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario/>>.

REZENDE RS. 2018. Análise morfométrica, histológica e de colágeno em feridas cutâneas de coelhos tratadas e não tratadas com plasma rico em plaquetas de equino. Tese (Doutorado). Universidade Feredeal de Uberlândia – UFU. Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.798>

SHAFIQUE M, et al. 2021. Bio-functional hydrogel membranes loaded with chitosan nanoparticles for accelerated wound healing. IntJ of Biol Macromol 170: 207–221.

SU L, ZHENG J, WANG Y, ZHANG W & HU D. 2019. Emerging progress on the mechanism and technology in wound repair. Biomedicine & Pharmacotherapy 117: 109191.

VERBEKEN G, et al. 2009. Glycerol treatment as a bacteriological decontamination procedure for contaminated already cryo-preserved donor skin: Methodology and evaluation 35: S12–S13.

WANG C, CHU C, ZHAO X, YANG Y, HU C, LIU L, LI J, QU Y & MAN Y. 2022. The diameter factor of aligned membranes facilitates wound healing by promoting epithelialization in an immune way. Bioact Mater 11: 206–17.

WONG SL, DEMERS M, MARTINOD K, GALLANT M, WANG Y, GOLDFINE AB, KAHN CR & WAGNER DD. 2015. Diabetes Primes Neutrophils to Undergo NETosis, Which Impairs Wound Healing. Nat Med 21(4): 815–819.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE TENSIOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MICROBIOLÓGICA DA PELE DE TILÁPIA FRESCA E CONSERVADA EM DIFERENTES MEIOS POR ATÉ 90 DIAS

Júnior Artur dos Reis. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção animal nos Trópicos, Universidade de Uberaba – UNIUBE. Avenida Tutunas, 720, Tutunas. CEP 38061500 - Uberaba, MG – Brasil. orcid.org/0000-0001-7598-6431

Marcelo Coelho Lopes. Setor de Patologia e MULTILAB, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. orcid.org/0000-0001-9775-1182

Endrigo Gabellini Leonel Alves. Instituto de Estudos Avançados Em Veterinária, Curso de Medicina Veterinária. Universidade de Uberaba – UNIUBE. Avenida Tutunas, 720, Tutunas. CEP 38061500 - Uberaba, MG – Brasil. orcid.org/0000-0001-8524-3949

Renato Linhares Sampaio. Instituto de Estudos Avançados Em Veterinária, Curso de Medicina Veterinária. Universidade de Uberaba – UNIUBE. Avenida Tutunas, 720, Tutunas. CEP 38061500 - Uberaba, MG – Brasil. orcid.org/0000-0003-2585-9543

RESUMO:

A pele de tilápia tem se destacado como biomaterial promissor no tratamento de feridas, devido à sua elevada concentração de colágeno, biocompatibilidade, disponibilidade e baixo custo. Este estudo avaliou três métodos de conservação da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) — congelamento a -18 °C, glicerina a 98% e solução salina hipersaturada — com foco nos efeitos sobre as propriedades mecânicas, morfológicas, colagênicas e microbiológicas ao longo de 30, 60 e 90 dias. Todas as amostras foram submetidas previamente à antisepsia com clorexidina a 2% e avaliadas por testes tensiométricos, histológicos histoquímicos e microbiológicos. Os resultados demonstraram que o congelamento preservou com maior eficiência a resistência mecânica da pele até 30 dias, enquanto a glicerina manteve essa propriedade de forma superior aos 90 dias. A análise histoquímica indicou estabilidade nas

concentrações de colágenos tipo I e III em todos os métodos, sem alterações significativas ($p < 0,05$). Não houve crescimento microbiano em nenhuma das amostras após o preparo, demonstrando a eficácia do protocolo de desinfecção. A pele conservada em glicerina apresentou superioridade na preservação morfológica ao longo do tempo, com ausência de desorganização do tecido conjuntivo denso. Conclui-se que a escolha do método de preservação deve considerar o tempo de armazenamento pretendido, sendo o congelamento mais indicado para curto prazo e a glicerina para períodos prolongados. Os resultados reforçam o potencial da pele de tilápia como biomembrana estéril e funcional para aplicação clínica no tratamento de feridas, contribuindo para o desenvolvimento de bancos de tecidos acessíveis e eficazes.

Palavras-chave: Biomembrana; cicatrização de feridas; colágeno; métodos de preservação.

TENSIOMETRIC, HISTOMORPHOMETRIC AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF FRESH TILAPIA SKIN AND SKIN PRESERVED IN DIFFERENT MEDIA FOR UP TO 90 DAYS

ABSTRACT:

Tilapia skin has stood out as a promising biomaterial for wound treatment due to its high collagen content, biocompatibility, availability, and low cost. This study evaluated three preservation methods for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin—freezing at -18°C , 98% glycerol, and hypersaturated saline solution—focusing on their effects on the mechanical, morphological, collagenous, and microbiological properties over 30, 60, and 90 days. The samples were previously subjected to antisepsis with 2% chlorhexidine and assessed through tensiometric, histochemical, and microbiological analyses. The results showed that freezing best preserved the mechanical strength of the skin up to 30 days, while glycerol maintained this property more effectively at 90 days. Histochemical analysis indicated stability in type I and III collagen concentrations across all methods, with no significant alterations. No microbial growth was observed in any of the samples after preparation, demonstrating the effectiveness of the

disinfection protocol. Glycerol-preserved skin showed superior morphological preservation over time, with no disorganization of the dense connective tissue. It is concluded that the choice of preservation method should take into account the intended storage duration, with freezing being more appropriate for short-term use and glycerol for longer periods. The results reinforce the potential of tilapia skin as a sterile and functional biomembrane for clinical application in wound care, contributing to the development of accessible and effective tissue banks.

Keywords: Biomembrane; wound healing; collagen; preservation methods.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais extenso do corpo que com uma intrincada composição, e atua, principalmente, como barreira protetora entre o corpo e o ambiente externo, protegendo-o contra danos físicos, ação de patógenos e perda de líquidos. O comprometimento da integridade da pele pode ocasionar feridas que por sua vez desencadeiam uma série de processos que levam à reparação do tecido (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019). No entanto, o processo de reparação das feridas, quando sem intervenção, pode não resultar na total recuperação funcional ou estética do tecido lesado. Logo, a utilização de técnicas que auxiliem nesse processo são fundamentais para auxiliar o processo de cicatrização de modo eficaz (SU et al., 2019).

Nesse sentido a bioengenharia tecidual tem se dedicado ao desenvolvimento de biomateriais para melhorar o processo de reparo, como por exemplo as biomembranas. Esses biomateriais são dispositivos de origem sintética, natural ou natural quimicamente modificada, os quais estimulam a proliferação de novas células. A biomembrana deve ser biocompatível, (O'BRIEN, 2011; CARDOSO, 2018) biodegradável (DE SOUZA et al., 2022), apresentar resistência mecânica adequada (CARDOSO, 2018), permeabilidade (MIGUEL et al., 2019). Sendo assim, o colágeno destaca-se dentre os principais componentes dos biomateriais, por possibilitar

biodegradabilidade e biocompatibilidade, somados à sua capacidade de orientar e estruturar os tecidos. durante a reparação tecidual (MACNEIL, 2007).

A pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um produto nobre e de alta qualidade, pois possui resistência peculiar (ALVES et al., 2015), além de 25% de colágeno em sua constituição, sendo comparável aos níveis de colágeno normalmente observados na pele de mamíferos (30%) (KARIM, BHAT; 2009). Contudo, em um estudo recente, Huang et al. (2024) demonstraram que o colágeno derivado da pele de tilápia apresentou potencial superior para permitir a migração, adesão e proliferação de fibroblastos derivados da pele humana quando comparado aos colágenos bovino e suíno. Além do mais a produção de tilápia vem crescendo de forma consistente com o passar dos anos, sendo atualmente a espécie de peixe mais cultivada pela piscicultura brasileira, tornando a pele de tilápia um produto de fácil acesso e de baixo custo (PSICULTURA, 2023).

A pele de tilápia vem sendo utilizada como biomembrana em tratamento de queimaduras tanto em humanos quanto em animais apresentando resultados satisfatórios em função da elevada concentração de colágenos tipos 1 e 3, além de ômega 3, o qual é responsável por diminuir os fatores inflamatórios e aspectos necróticos da ferida causados pela alta temperatura no processo de formação da ferida (AIUB; PASSINI, 2019; COSTA, 2022; LIMA-JUNIOR et al., 2016).

Para garantir a disponibilidade de biomembranas é essencial um banco de tecidos onde seja feita de maneira adequada a conservação dessas biomembranas. Vários métodos tem sido propostos para a conservação das peles de tilápia, como congelamento, secagem (BORGES DE MIRANDA, 2018), criopreservação (IBRAHIM et al., 2020; MIRANDA; BRANDT, 2019), glicerinalização (LIMA-JUNIOR et al., 2020). Esses meios de conservação influenciam de maneiras distintas as características da pele de tilápia, como viabilidade celular

(KOHLHAUSER et al., 2021; NIE et al., 2022) e crescimento bacteriano (IBRAHIM et al., 2024) podendo comprometer sua eficácia (COSTA et al., 2022).

A glicerina e a criopreservação são utilizados como métodos de armazenamento e preservação (LIMA-JUNIOR et al., 2020). A glicerina é um composto orgânico higroscópico, ou seja, possui alta capacidade de remover água do tecido. Sendo assim, na conservação com glicerina ocorre desidratação das células, o que é facilmente revertido após reidratação do tecido (KARAM et al., 2016). Alves et al. (2018) observaram em seus estudos que a pele de tilápia submetida a este protocolo, mesmo após a reidratação a pele é histologicamente semelhante à pele de tilápia *in natura*, apresentando uma pequena desorganização nas fibras colágenas, mas com reduzida significância clínica.

A criopreservação é um método eficaz baseado no congelamento de tecidos em temperaturas de -80°C (HERMANS, 2011). Contudo, alterações na estrutura dos tecidos preservados pela criopreservação podem ocorrer em função da temperatura extremamente baixa, impactando na eficácia da biomembrana (BADYLAK et al., 2009; LING et al., 2023). Ao passo que o impacto morfológico do congelamento em temperaturas abaixo de 0°C mais elevadas não foi avaliado, podendo ser uma alternativa eficaz.

Outro método eficaz utilizado é a solução hipersaturada do sal NaCl, que preparada na concentração de 1,5g de sal para 1mL (150%) de água tridestilada, além de preservar a maleabilidade do tecido, possui propriedades antissépticas que inibem o crescimento de bactérias e fungos (BRUN et al., 2002). A solução hipersaturada de sal demonstrou ser eficaz em preservar as estruturas macroscópicas de amostras de cérebro e fígado humano (JUMLONGKUL, TRAITHEPCHANAPAI; 2017). Entretanto, no que diz respeito à microestrutura, um experimento de conservação de pericárdio bovino em solução hipersaturada de sal demonstrou desencadear processo de autólise do tecido conjuntivo, alterando a estrutura e eficácia da biomembrana (BARIANI JÚNIOR et al., 2014).

Com isto, em vista da constante necessidade de refinamento de técnicas de preservação de materiais utilizados em procedimentos clínicos e cirúrgicos, no presente estudo buscou avaliar a eficácia de diferentes técnicas de preservação e o melhor período para utilização da pele de tilápia, caracterizando-a através de suas propriedades biomecânicas, microbiológicas e histológicas em intervalo de tempos diferentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética Em Experimentação Animal sob o protocolo de número 012/2018.

2.1. PREPARO DAS PELES E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas peles de tilápias (*Oreochromis niloticus*), provenientes de abatedouro localizado na cidade de Nova Ponte, MG. Antes do abate, os animais foram dessensibilizados por imersão em água a 1°C, saturada com CO₂, eviscerados e, em seguida, as peles foram removidas mecanicamente, lavadas em água corrente limpa e transportadas refrigeradas até o Hospital Veterinário da UNIUBE.

As peles frescas foram avaliadas de acordo com o tamanho e condição geral, sendo descartadas aquelas que não possuíam, no mínimo, 15 cm de comprimento ou apresentavam outras alterações físicas, como deformação, corte etc.

Após a seleção, as peles foram descamadas manualmente e lavadas em água corrente para a remoção de impurezas residuais. Todas as peles selecionadas foram imersas em recipiente estéril contendo solução aquosa de gluconato de clorexidina 2%, por 30 minutos, sendo massageadas a cada cinco minutos. Posteriormente, enxaguou-se as peles com solução fisiológica até remoção de todo o produto. Utilizando compressas estéreis, as peles foram secas e separadas em quatro grupos de acordo com o tratamento a ser testado:

Pele Fresca: As peles deste grupo não sofreram nenhum tratamento adicional. Após a limpeza com gluconato de clorexidina 2%, as peles foram recortadas de acordo com o corpo de prova para testes mecânicos. As amostras que foram coletadas para análises microbiológicas foram acondicionadas em frascos de vidro estéril de modo que cada frasco continha no máximo 15 amostras. Por fim, as amostras encaminhadas para o laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário de Uberaba. Fragmentos de pele para histologia foram armazenados em solução tamponada de formol 10% para posterior análise.

Solução salina hipersaturada: A solução foi preparada com 300 g de NaCl para cada 200 mL (150%) de água tridestilada. Posteriormente à limpeza, as peles foram massageadas por 5 minutos na solução salina, individualmente enroladas em forma de charuto e depositadas em quatro frascos de vidro herméticos e estéreis, preenchido com solução salina hipersaturada, contendo 15 unidades de pele por frasco.

Congelamento: as peles limpas e secas foram agrupadas e embalada a vácuo em envelopes plásticos estéreis. Cada envelope recebeu 15 peles. Após a selagem dos envelopes, os mesmos foram armazenados em freezer a -18°C.

Glicerina: As peles limpas foram adicionadas em frascos de vidro devidamente datados e identificados contendo solução 50% de glicerina e 50% de soro fisiológico, massageadas a cada 5 minutos para homogeneização da solução por 30 minutos. Em seguida, as peles foram lavadas duas vezes com solução fisiológica estéril e transferidas para recipientes herméticos e estéreis contendo solução com 75% de glicerina e 25% de soro fisiológico, sendo massageadas também por 5 minutos. Posteriormente, os recipientes com as peles foram submersos em banho-maria na temperatura de 37°C, sendo massageadas a cada 15 minutos por 3 horas. Após esta etapa, as peles foram removidas dos recipientes, novamente lavadas com solução fisiológica estéril e massageadas por mais 5 minutos, porém, em solução de glicerina 98%. Logo após, foram

individualmente enroladas e armazenadas em frascos herméticos e estéreis contendo a solução de glicerina 98% e 15 amostras de pele cada.

2.2. AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA

Todos os grupos foram avaliados em 30, 60 e 90 dias por teste de análise de resistência à micro tração, utilizando-se a Máquina Universal de Ensaios (EMIC, DL 30006), com célula de força Trd 21, capacidade de 50 N (5kgf) e resolução de leitura de 0,01 N (1kgf). Foram utilizadas 50 amostras de cada grupo. As amostras foram recortadas em sentido transversal da pele. Os testes biomecânicos de força de tração e tensão foram realizados no Laboratório de Ensaio dos Materiais e Testes Mecânicos da Universidade de Uberaba.

Para a realização do teste biomecânico de resistência à micro tração, as peles foram preparadas promovendo-se a padronização de corpos de prova, por meio de molde de acrílico, de forma que cada amostra apresentasse 7 cm de comprimento, 2 cm de largura nas extremidades e 1,5 cm de largura em região central do fragmento (formato de ampulheta – Figura 01).

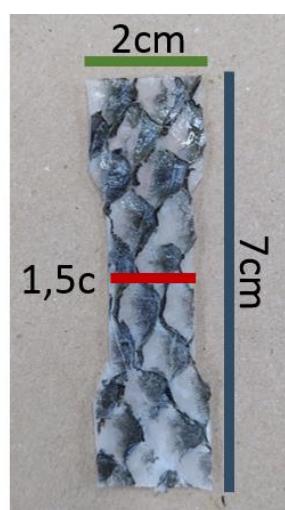


Figura 1- Corpo de prova em formato de ampulheta. Corpo de prova de pele de tilápia confeccionado com auxílio de molde de acrílico para garantir igualdade entre as amostras.

As amostras mantidas em glicerina a 98% e em solução salina foram lavadas, massageadas e reidratadas em solução fisiológica estéril por 15 minutos antes dos testes. As

peles congeladas foram descongeladas em temperatura ambiente, não sendo necessário limpeza prévia ou reidratação.

Após serem secos com papel toalha, os corpos de prova foram fixados em garras com sistema de auto travamento por efeito de alavanca, fixadas à Máquina Universal de Ensaios (EMIC, DL 30006). Para fixação dos corpos de prova na máquina foi utilizado acessório que contém ranhuras em sua superfície, evitando o escorregamento do material durante o ensaio. Posteriormente à fixação, os corpos de prova foram submetidos à aplicação de força progressiva de micro tração, a qual consistiu em submeter o material a uma carga progressiva até sua ruptura (Figura 02). Os valores de carga máxima suportados pelo tecido até se romperem foram registrados com o auxílio do software Tesc 1.10 (Programa de automação de ensaios, compatível com as máquinas de ensaios microprocessadas EMIC, DL 30006).

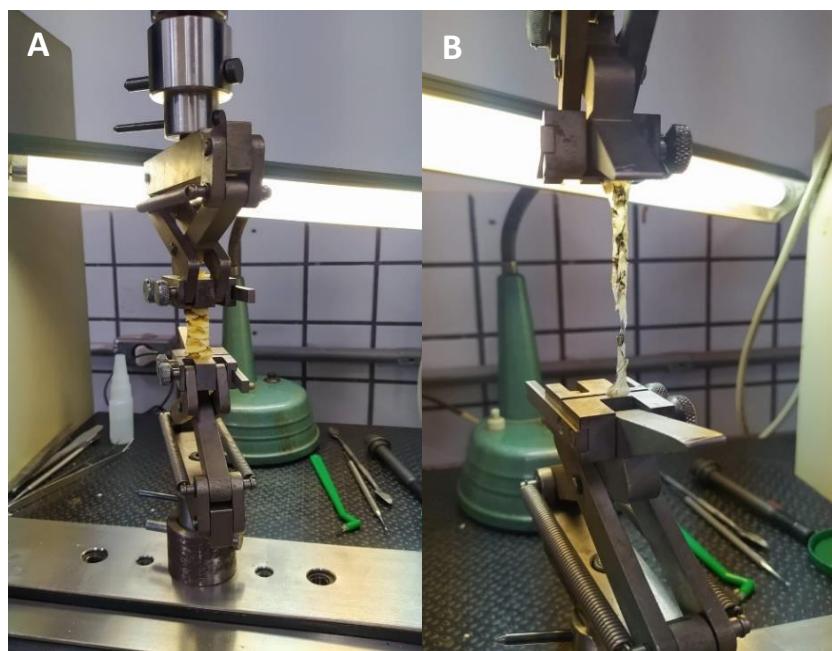


Figura 2- Corpo de prova fixado à Máquina Universal de Ensaios – EMIC, DL 30006. Em A) observa-se o corpo de prova fixo pelas garras antes do teste de tensometria. Em B), o corpo de prova no momento de ruptura da pele causado pelo afastamento progressivo do maquinário.

2.3. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Exames microbiológicos para identificação de crescimento bacteriano nas peles de tilápia foram realizados no laboratório de pesquisa em sanidade e produção animal nos trópicos, também localizado nas dependências do HVU.

Inicialmente, foram submetidas ao exame microbiológico as peles frescas, com o objetivo se se conhecer o perfil microbiológico das peles antes dos tratamentos proposto.

Posteriormente, ao final dos tempos definidos de observação aos 30, 60 e 90 dias, para todos os tratamentos propostos, os recipientes e envelopes eram abertos e amostras de pele colhidas de forma estéril e aleatória. Foram colhidas de cada grupo 06 amostras dos meios de preservação e 06 swabs da superfície das peles tratadas aos 30, 60 e 90 dias.

As amostras foram colhidas em ambiente estéril e em capela com fluxo laminar horizontal. Imediatamente após a colheita, as amostras eram semeadas em meio ágar sangue de carneiro a 5% e incubados por 72h a 37°C em estufa com atmosfera controlada em 5% de CO₂, propiciando ambiente favorável ao crescimento bacteriano *in vitro* do material recuperado dos meios de preservação e da superfície da pele de tilápia.

2.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Amostras de pele fresca e preservadas nos diferentes meios foram colhidas em cada tempo de preservação e submetidas à técnica de processamento histológico de rotina, conforme Luna (1968). Inicialmente foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por 48 horas, clivadas e processadas em séries crescentes de álcool, xilol, seguidas de inclusão em parafina.

2.5. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA

Foram utilizadas 10 amostras de cada grupo em cada um dos tempos para cada coloração histológica realizada. Os tecidos corados com hematoxilina e eosina e Picosirius Red.

Lâminas coradas com Hematoxilina e eosina foram examinadas em microscópio óptico Opticam, modelo 0500 Research. A morfologia das fibras de tecido conjuntivo foi avaliada nas objetivas de 4x e 10x.

Para a coloração com Picrosírius Red as lâminas foram examinadas em microscópio óptico Opticam, modelo 0500 Research, sob luz polarizada. Com o auxílio de uma câmera acoplada e do software Opticam® OPTHD (versão 3.7), para cada lâmina (referente a cada tratamento e tempo), foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios, com a objetiva de 40x (400X de ampliação). Assim como para as peles frescas e para cada grupo de tratamento nos três tempos de preservação, foram avaliadas as concentrações de colágeno tipos I e III. Foram capturadas 10 imagens de diferentes campos para cada grupo, obtendo-se, no total, 160 imagens. Para garantir uma melhor qualidade da avaliação, preservou-se o fundo escuro e birrefringência máxima das cores vermelha (colágeno tipo I) e verde (Colágeno tipo III) (COELHO et al., 2018).

As imagens foram analisadas pelo software de processamento de imagem *Image J*. Para isso, utilizou-se o método de análise por segmentação de cor, obtendo valores mediante análise da tonalidade e dessa forma quantificando a porcentagem de colágeno em uma determinada área conforme descrito em estudos prévios (BASTIANI et al., 2023; BEDOYA et al., 2019). Todas as 160 imagens foram avaliadas tanto para a função vermelho, quanto para a função verde, assim obtendo um total de 320 análises.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância fatorial Two-Way ANOVA, com avaliação dos contrastes das médias, por meio do teste de Tukey considerando-se 5% de diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando o software Graphpad Prism 8.

3. RESULTADOS

3.1. PREPARO DAS AMOSTRAS

Tanto as peles preservadas em solução salina hipersaturada, quanto aquelas preservadas em glicerina, mostraram-se íntegras após serem hidratadas. Bem como as peles congeladas, que após descongelamento mantiveram-se viáveis para análise, não havendo diferenças macroscópicas perceptíveis entre os grupos. Portanto, todas as amostras foram encaminhadas para os testes subsequentes. Sendo assim, o preparo das amostras foi satisfatório favorecendo a qualidade do corpo de prova.

3.2. AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA

Os testes de tensão e força máxima demonstraram maior resistência mecânica do grupo solução salina hipersaturada em relação aos demais grupos ($p<0,05$); enquanto que as peles de tilápia do grupo glicerina apresentaram resistência mecânica inferior a todos os demais grupos aos 30 dias de observação ($p<0,05$). Por fim, as amostras congeladas foram semelhantes ao controle (pele fresca), sugerindo este método como a alternativa mais viável no período de 30 dias (Figura 3A-B). Não foram verificadas diferenças significativas aos 60 dias entre as técnicas de conservação. Contudo, aos 90 dias, o melhor método foi o tratamento com glicerina, o qual apresentou resistência mecânica semelhante à de peles frescas, enquanto todos os demais foram inferiores ($p<0,05$).

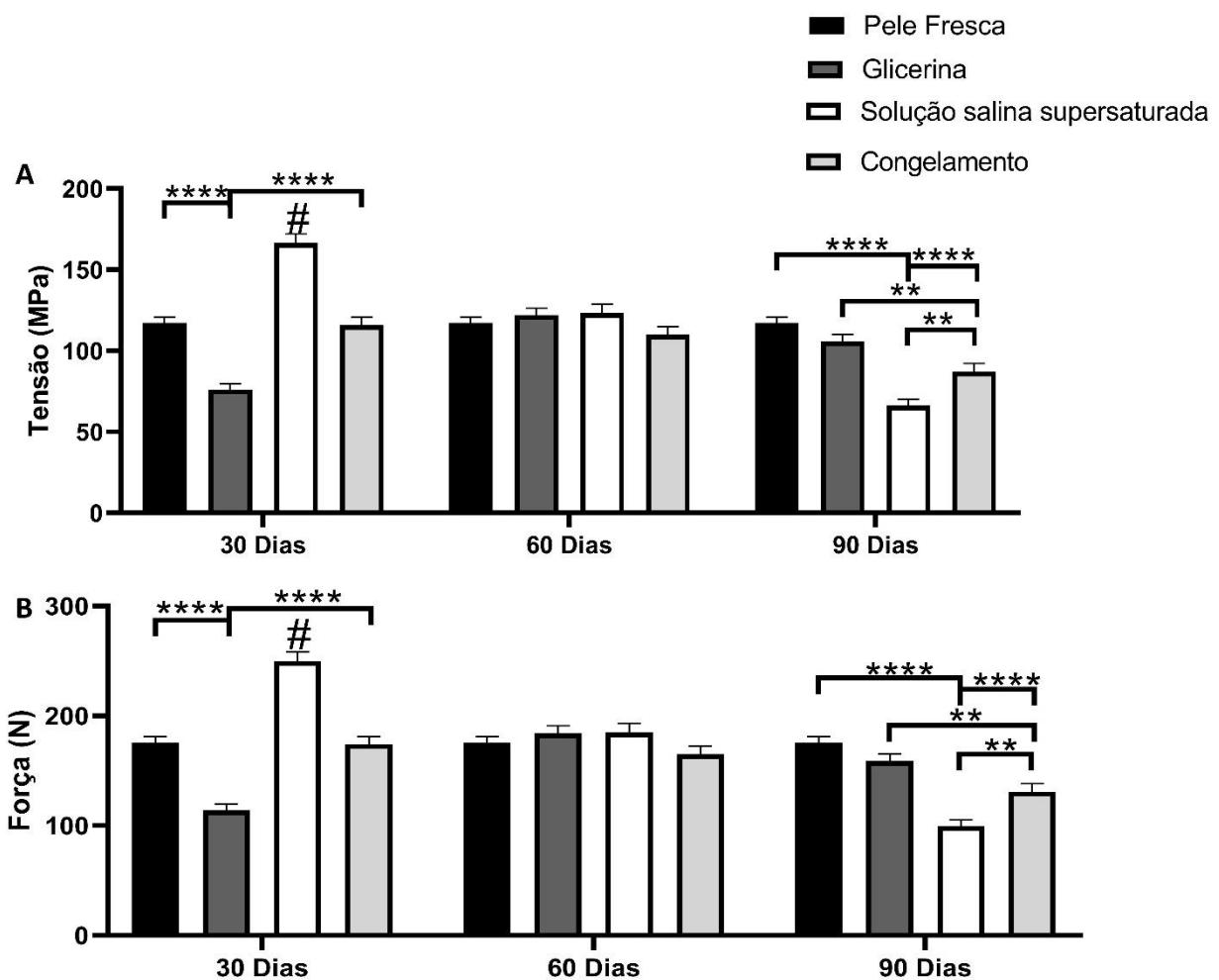


Figura 3 - Comparação entre as variáveis Força e Tensão para cada tipo de tratamento e seus respectivos tempos de preservação. A) Gráfico de tensão obtido por ensaio de micro tração e B) Gráfico de força obtido por ensaio de micro tração. Os dados representam a média \pm erro padrão, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; para análise estatística realizada entre os grupos experimentais, e # $p \leq 0,001$ para solução salina em relação aos demais grupos avaliados $n = 50$.

As amostras preservadas em solução salina hipersaturada demonstraram perda progressiva de resistência mecânica (Figura 4 A-B), sendo significativamente menor que as demais.

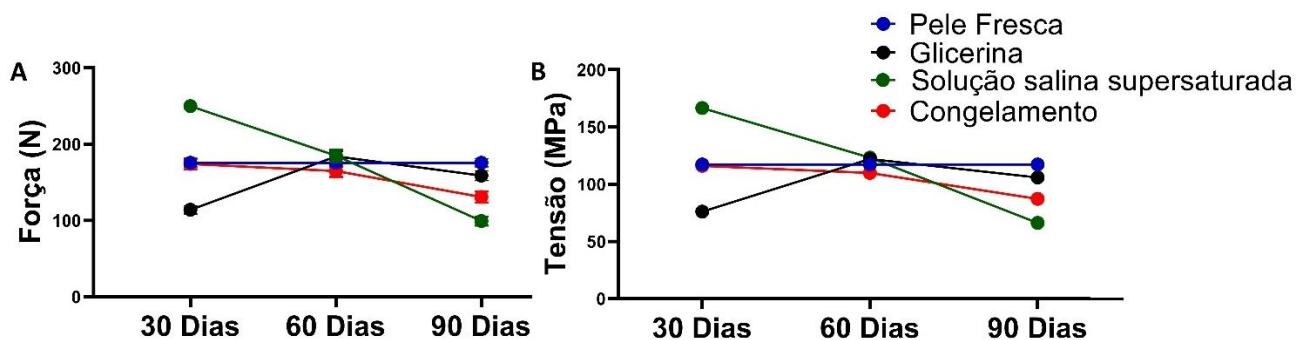


Figura 4 - Comparação entre as variáveis Força e Tensão para cada tipo de tratamento e seus respectivos tempos de preservação. A) Gráfico de comportamento de força ao longo do tempo B) Gráfico de comportamento de tensão ao longo do tempo.

3.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Das seis placas de crescimento de cultura a partir de pele de tilápia fresca, cinco apresentaram crescimento microbiológico, onde foram isoladas bactérias do gênero *Klebsilla* spp. e *Enterobacter* spp., ambas gram negativas.

Amostras coletadas da superfície da pele de tilápia fresca e das peles submetidas às diferentes técnicas de conservação, não apresentaram crescimento bacteriano após o tratamento com clorexidine em 72 horas e em nenhum dos tempos de observação (30, 60 e 90 dias).

3.4. ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III

Os resultados da análise histoquímica com coloração Picosirius Red não demonstraram diferença estatística entre os grupos solução salina hipersaturada, congelamento e glicerina em nenhum dos tempos avaliados na análise da concentração de colágeno tipo I e III (Figura 5).

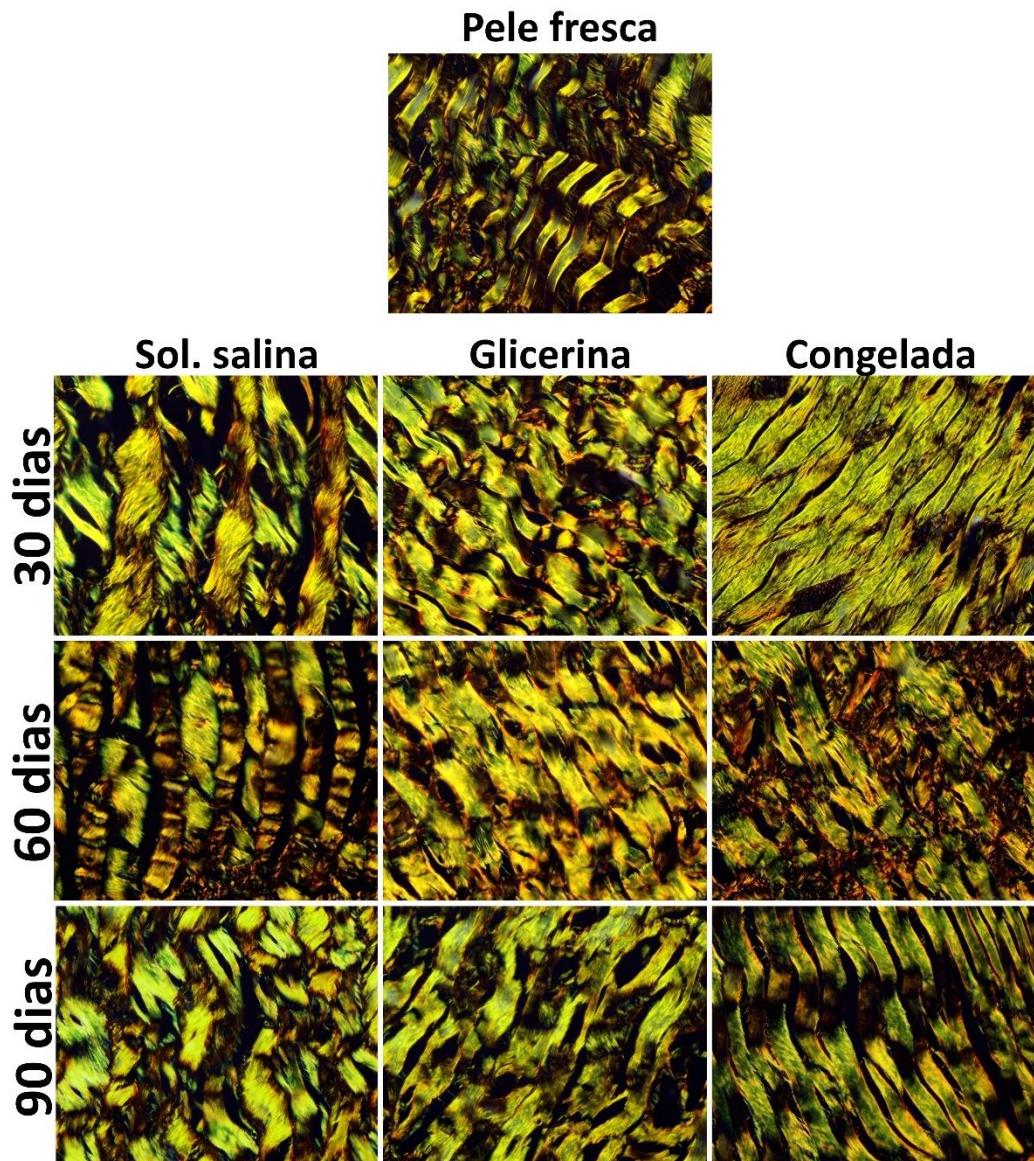


Figura 5 – Análise da concentração de colágenos tipo I e III presentes na pele de tilápia conservada em solução hipersaturada salina, por congelamento ou em glicerina, em períodos de 30, 60 e 90 dias. A) Imagem ilustrativa da coloração por Picosirius Red (PSR), objetiva 40x.

As amostras de pele fresca apresentaram maiores concentrações de colágeno tipo III e menores concentrações de colágeno tipo I quando comparadas com amostras de pele submetidas à preservação em todos os meios testados aos 60 dias de observação ($p<0,05$) (Figura 6 B-C). As concentrações de colágeno I e III se mantiveram constantes em todos os grupos tratados (Figura 7).

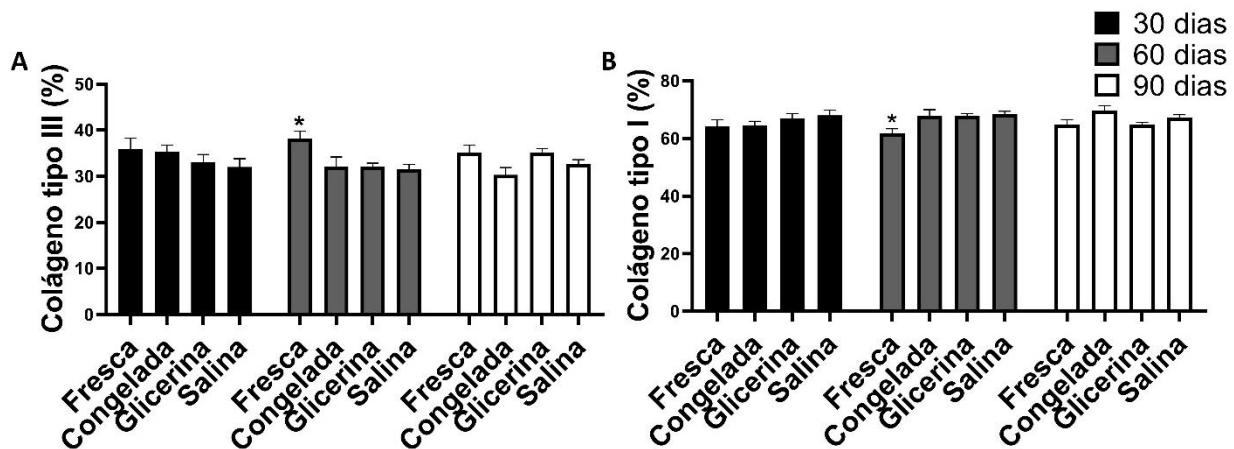


Figura 6 – Análise da concentração de colágenos tipo I e III presentes na pele de tilápia fresca e nos demais meios, em períodos de 30, 60 e 90 dias. A) Concentração de colágeno tipo III obtida a partir do software Image J, plug-in Threshold Colour. e B) Concentração de colágeno tipo I obtida a partir do software Image J, plug-in Threshold Colour. Os dados representam a média \pm SEM, sendo * $p \leq 0,05$ para pele fresca em relação aos demais grupos avaliados, $n = 10$.

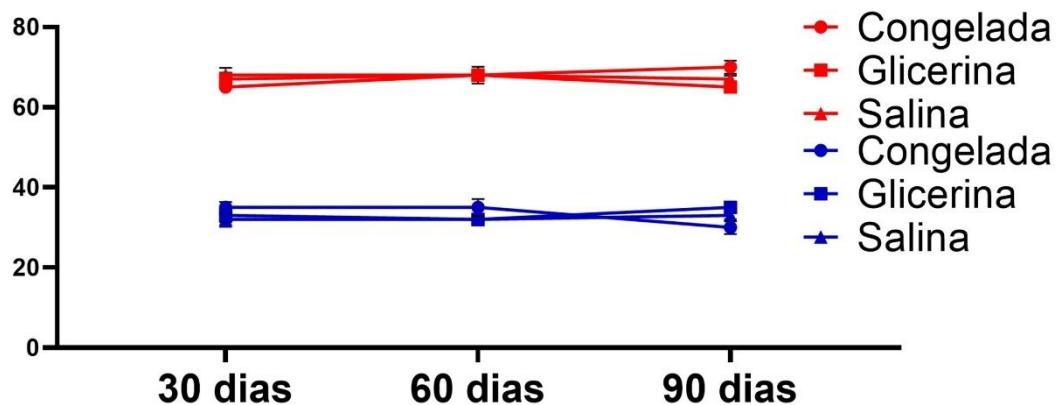


Figura 7 – Concentração de colágeno tipo I e III ao longo dos períodos de 30, 60 e 90 dias.

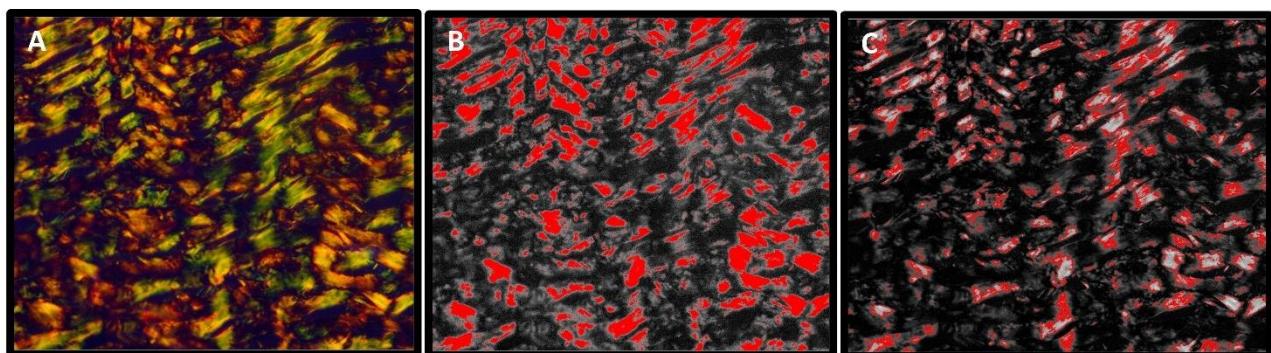


Figura 8 – Análise morfométrica de pele de tilápia preservada em Solução Salina por 60 dias obtida por segmentação de cor usando o software Image J, plug-in Threshold Colour. (A) Fotomicrografia da derme obtida sob luz polarizada, evidenciando colágenos tipo I (vermelho e/ou amarelo) e III (verde). (B) Segmentação do colágeno tipo I. (C) Segmentação do colágeno tipo III. Objetiva 40

A coloração de hematoxilina e eosina revelou fibras de tecido conjuntivo dispostas paralelamente com um espaçamento sutil observado mais claramente na objetiva de 10x (Figura 9 A-B). No período de 30 dias as fibras de tecido conjuntivo do grupo solução salina hipersaturada estavam distribuídas de forma irregular e com mais espaçamentos entre as fibras. As peles de tilápia dos grupos glicerina e congelamento apresentaram fibras de tecido conjuntivo dispostas de maneira semelhante a observada em pele fresca. O espaçamento entre as fibras de tecido conjuntivo denso observado em peles do grupo congelamento foram menores quando comparados ao grupo glicerina (Figura 9 C-H).

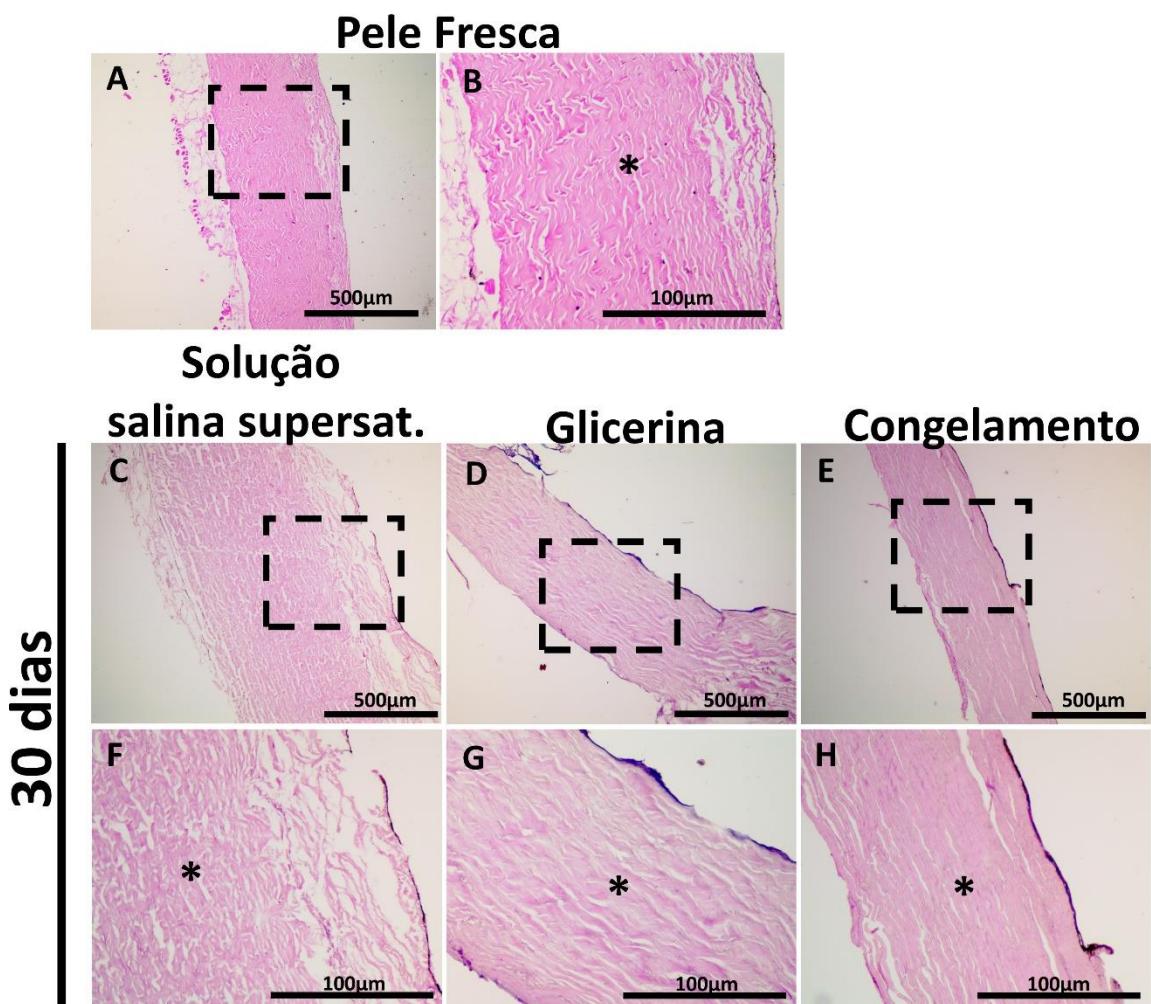


Figura 9 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de tilápia fresca e após conservação em solução hipersaturada salina, glicerina e congelamento em período de 30 dias. Hematoxilia eosina. Setas pretas: epitelização, Quadrado pontilhado: Região de zoom, *: Fibras de tecido conjuntivo denso. Figuras: A, C, D, E, obtidas em objetiva de 4x, demais imagens obtidas em objetiva de 10x.

No período de 60 dias não foi observada diferença significativa entre as amostras preservadas por diferentes meios de conservação.

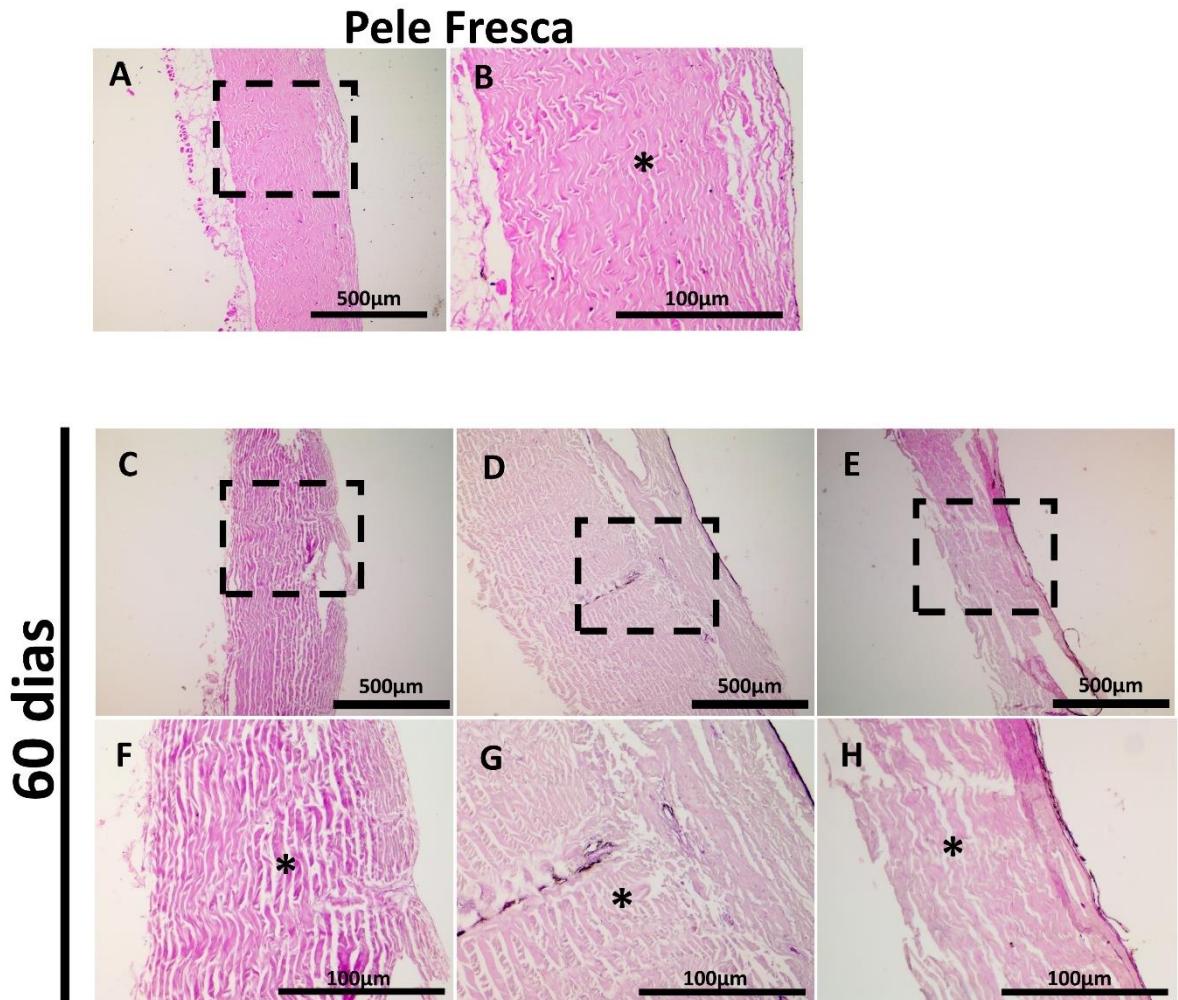


Figura 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de tilápia fresca e após conservação em solução hipersaturada salina, glicerina e congelação em período de 60 dias. Hematoxilia eosina. Setas pretas: epitelização, Quadrado pontilhado: Região de zoom, *: Fibras de tecido conjuntivo denso. Figuras: A, C, D, E, obtidas em objetiva de 4x, demais imagens obtidas em objetiva de 10x.

No período de 90 dias, curiosamente, apenas o grupo glicerina apresentou estrutura morfológica semelhante ao grupo pele fresca, mantendo a disposição das fibras de tecido conjuntivo em paralelo com espaçamento reduzido. Além disso, o grupo preservado por congelação apresentou espaçamentos visivelmente maiores entre as fibras de tecido conjuntivo em relação aos demais modos de conservação avaliados neste trabalho (Figura 11 C-H).

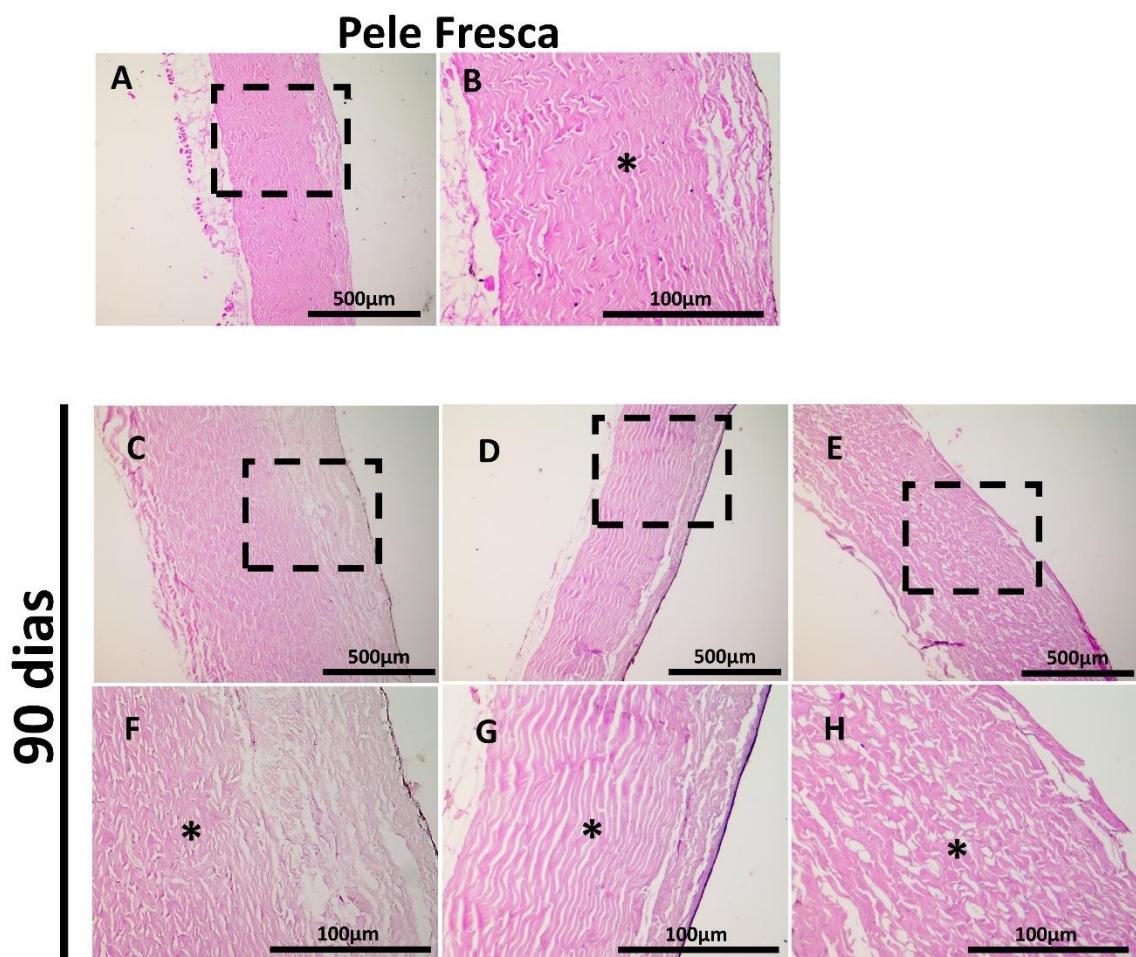


Figura 11 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de tilápia fresca e após conservação em solução hipersaturada salina, glicerina e congelamento em período de 90 dias. Hematoxilia eosina. Setas pretas: epitelização, Quadrado pontilhado: Região de zoom, *: Fibras de tecido conjuntivo denso. Figuras: A, C, D, E, obtidas em objetiva de 4x, demais imagens obtidas em objetiva de 10x.

4. DISCUSSÃO

A conservação de pele de tilápia em solução salina hipersaturada desidrata o tecido por osmose. Alonso et al. (1996) observaram que níveis baixos de hidratação induzem a redução drástica da capacidade elástica da epiderme, ou seja, aumenta a rigidez do tecido, assim como relatado por Grant et al. (2009) que descreveram aumento da rigidez das fibras de colágeno quando desidratadas em etanol, que justificaria um aumento inicial da resistência mecânica observado neste trabalho em peles tratadas com solução hipersaturada de NaCl.

Durante o período de conservação, observou-se redução progressiva na resistência mecânica das peles armazenadas em solução salina hipersaturada. Essa diminuição favoreceu a sedimentação do cloreto de sódio (NaCl) no fundo dos frascos de armazenamento,

especialmente em temperaturas mais baixas, -4 °C, que contribuiu para a formação de cristais de sal. A ausência de homogeneização periódica das soluções ao longo dos 90 dias de conservação pode ter resultado em concentrações variáveis de NaCl nas diferentes regiões dos frascos. Consequentemente, as peles posicionadas em contato direto com os depósitos de sal no fundo dos recipientes podem ter sido expostas a concentrações mais elevadas de NaCl, enquanto outras, localizadas em regiões superiores, permaneceram em soluções menos concentradas. Essa heterogeneidade na concentração salina pode ter influenciado as propriedades estruturais e mecânicas das peles, contribuindo para a variabilidade observada nos resultados. Estudos anteriores destacam a importância da manutenção da homogeneidade em soluções conservantes para garantir a uniformidade na preservação de tecidos biológicos (BRUN et al., 2002).

Segundo Fernández-Díaz et al. (2003) o congelamento e descongelamento de amostras pode afetar a estrutura fibrilar do colágeno e consequentemente alterar suas propriedades mecânicas. Tal afirmação foi confirmada por Bordigon et al. (2012) os quais verificaram melhores propriedades mecânicas em géis de colágeno extraídos da pele de tilápia conservada pelo método da salga a seco em comparação aos géis extraídos de peles de tilápia conservadas por congelamento.

Bordignon et al., (2019) avaliaram os métodos de conservação de peles de tilápia do Nilo por congelamento e salga a seco e concluíram que o congelamento e descongelamento podem levar à degradação do colágeno, evidenciada pela perda de componentes de maior peso molecular, como as frações β e γ , o que compromete a integridade estrutural das fibras colágenas. Em contrapartida, peles conservadas por salga tendem a preservar melhor a estrutura do colágeno, resultando em gelatinas com maior força de gel e viscosidade. Essas diferenças são atribuídas à menor degradação do colágeno nas peles salgadas, o que mantém as propriedades mecânicas desejáveis para aplicações biomédicas. Portanto, a escolha do método de conservação é crucial para manter a funcionalidade da pele de tilápia como biomaterial.

A conservação da pele de tilápia em glicerina demonstrou eficácia na manutenção das propriedades mecânicas do tecido, especialmente nos períodos de 60 e 90 dias, apresentando resistência semelhante à das peles frescas. No entanto, aos 30 dias, observou-se uma resistência inferior, sugerindo que o processo de estabilização promovido pela glicerina requer um período mínimo para alcançar sua máxima eficácia. Estudos indicam que a glicerina atua como um agente conservante eficaz, promovendo a esterilização do material e mantendo sua integridade estrutural ao longo do tempo. Portanto, a escolha do método de conservação deve considerar o tempo de armazenamento e o uso pretendido para o material biológico, sendo o congelamento mais adequado para períodos curtos e a glicerina recomendada para aplicações que demandem preservação prolongada com manutenção das características morfológicas do tecido.

De acordo com Alves et al. (2015), a carga máxima média observada em testes de tração realizados com pele de tilápia do Nilo foi de $43,967 \pm 26,248$ N. As peles utilizadas em seu trabalho também foram submetidas a um processo de esterilização com solução aquosa de clorexidina e posteriormente pela imersão gradual em glicerina (50%, 75%, 100%). Tanto o formato dos corpos de prova (ampulheta) como o processo de hidratação após retirada do meio de preservação foram semelhantes aos deste estudo.

No presente estudo, independentemente do método de conservação empregado — solução salina hipersaturada, congelamento ou glicerina a 98% — a força necessária para a ruptura das amostras de pele não foi inferior a 90 N em nenhum dos grupos, demonstrando desempenho significativamente superior ao relatado anteriormente na literatura. Esses achados sugerem que todos os métodos testados foram eficazes na manutenção das propriedades mecânicas da pele, mesmo após períodos prolongados de preservação de até 90 dias. Ressalta-se que o protocolo padronizado de preparo, incluindo a antisepsia com clorexidina e o acondicionamento controlado, pode ter contribuído para a integridade estrutural observada. Além disso, a maior resistência observada pode estar relacionada à espessura e organização das

fibras colágenas, que foram preservadas de maneira satisfatória, conforme demonstrado nas análises histoquímicas com coloração por Picrosírus Red, as quais não evidenciaram degradação significativa do colágeno tipo I ou III durante o período de estudo. Tais resultados reforçam a viabilidade da pele de tilápia como biomaterial de uso clínico, sobretudo em aplicações que demandam resistência mecânica, como o recobrimento de feridas extensas ou áreas de maior tensão cutânea.

As concentrações de colágeno tipo I e III foram avaliadas nos diferentes meios de preservação da pele de tilápia ao longo do tempo. A única diferença estatisticamente significativa foi observada aos 60 dias, entre a pele fresca e todos os demais grupos tratados, sendo que a pele fresca apresentou maior concentração de colágeno tipo III e menor concentração de colágeno tipo I. Este achado sugere que, ao longo do tempo de preservação, pode ocorrer uma reorganização da matriz extracelular com predominância relativa do colágeno tipo I nos grupos preservados, o que pode estar associado a alterações estruturais adaptativas dos tecidos submetidos aos diferentes meios de conservação. Tais resultados divergem dos apresentados por Ibrahim et al. (2020), que relataram alterações significativas na concentração de colágeno após 15 minutos de exposição da pele à clorexidina. No entanto, é importante considerar que, no presente estudo, a clorexidina foi empregada apenas no preparo inicial das amostras, sendo seguida por etapas de lavagem, o que pode ter reduzido sua ação residual e seus efeitos sobre a matriz colagênica.

Além disso, os demais grupos preservados — solução salina hipersaturada, congelamento e glicerina a 98% — não apresentaram diferenças estatísticas entre si em nenhum dos tempos avaliados (30, 60 e 90 dias), indicando que todos os métodos foram igualmente eficazes na preservação das fibras colágenas da pele de tilápia. A estabilidade das proporções de colágeno tipo I e III ao longo do tempo reforça a viabilidade dos métodos utilizados e sua

aplicabilidade como estratégia de conservação para uso clínico da biomembrana. A manutenção do conteúdo de colágeno é particularmente relevante, considerando que essa proteína é essencial para a integridade estrutural, resistência mecânica e capacidade de regeneração da pele quando utilizada como enxerto ou curativo biológico. Como demonstrado por Huang et al. (2024), o colágeno de tilápia apresenta potencial superior para promover adesão, migração e proliferação de fibroblastos humanos, destacando-se como biomaterial promissor em medicina regenerativa.

Os resultados da caracterização microbiológica obtidos neste estudo corroboram com os achados de Lima Júnior et al. (2016), os quais descreveram a presença de ampla diversidade bacteriana na pele e cavidade oral de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), incluindo espécies do gênero *Klebsiella*. De forma semelhante, Rodrigues (2007), utilizando diferentes meios de cultura seletivos, identificou uma predominância de bactérias gram-negativas em cortes frescos de pele de tilápia, com destaque para os gêneros *Aeromonas*, *Vibrio* e *Pseudomonas*, além de representantes da família *Enterobacteriaceae*. Esses achados são consistentes com outros relatos da literatura, que apontam a microbiota superficial da tilápia como majoritariamente composta por bactérias gram-negativas (DE OLIVEIRA et al., 2003; LIMA JÚNIOR et al., 2016; MARIA MOLINARI et al., 2003).

No presente estudo, a análise microbiológica demonstrou crescimento bacteriano apenas nas amostras de pele fresca, antes da aplicação da técnica de preparo, nas quais foram isoladas *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*, indicando a presença de contaminação microbiológica endógena ou ambiental antes do tratamento. Após a aplicação da antisepsia com solução de clorexidina 2% e a posterior conservação nos diferentes meios (solução salina hipersaturada, congelamento e glicerina a 98%), nenhuma amostra apresentou crescimento bacteriano após o preparo e nos períodos de 30, 60 ou 90 dias. Esses resultados demonstram a

eficácia do protocolo de preparo, com ênfase no papel da clorexidina como agente antisséptico de amplo espectro, eficaz na redução da carga microbiana superficial.

Adicionalmente, os meios de conservação utilizados parecem ter contribuído para a inibição do crescimento bacteriano ao longo do tempo, atuando de forma sinérgica ao tratamento inicial. A glicerina, por exemplo, possui propriedades antimicrobianas intrínsecas, conforme evidenciado por Gholipourmalekabadi et al. (2020), sendo capaz de desidratar microrganismos e impedir sua proliferação. Da mesma forma, a alta osmolaridade da solução salina hipersaturada cria um ambiente hiperosmótico que limita a sobrevivência de bactérias não halotolerantes, enquanto o congelamento interrompe a atividade metabólica bacteriana (Brun, et al., 2002). Portanto, os achados do presente estudo reforçam a eficácia dos métodos de conservação empregados tanto na manutenção da esterilidade quanto na segurança microbiológica da pele de tilápia, tornando-a um biomaterial promissor para uso clínico.

Partindo da análise inicial das amostras frescas e considerando o protocolo de desinfecção adotado, observa-se que a clorexidina 2% foi altamente eficaz no controle microbiológico da pele de tilápia, uma vez que, após a antisepsia, não foi detectado crescimento bacteriano em nenhum dos períodos de avaliação (30, 60 e 90 dias), independentemente do método de conservação. Este resultado está em consonância com os achados de Ibrahim et al. (2020), que relataram redução significativa da carga microbiana em peles de tilápia tratadas com clorexidina a 4%, demonstrando sua eficácia como agente antisséptico de amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Além disso, os resultados do presente estudo corroboram com os obtidos por Bariani Júnior et al. (2014), os quais avaliaram o pericárdio bovino conservado em diferentes meios, incluindo glicerina a 98%, açúcar, mel e sal, e verificaram ausência de crescimento microbiano nos grupos conservados com glicerina e solução salina hipersaturada. De maneira semelhante,

Brun et al. (2004) demonstraram que centros frênicos caninos preservados nesses mesmos meios, por até 90 dias, também não apresentaram crescimento de colônias bacterianas ou fúngicas. Tais evidências, somadas aos dados do presente trabalho, indicam que tanto a glicerina a 98% quanto a solução hipersaturada de sal são métodos eficazes na inibição do crescimento microbiano a longo prazo, especialmente quando precedidos de um protocolo de desinfecção eficiente.

É importante destacar que a glicerina, além de atuar como agente desidratante e barreira física à proliferação bacteriana, apresenta propriedades antimicrobianas documentadas, como demonstrado por Gholipourmalekabadi et al. (2020), enquanto a solução salina hipersaturada cria um ambiente hiperosmótico desfavorável à sobrevivência de microrganismos não halotolerantes. A eficácia dessas abordagens de conservação reforça a viabilidade do uso da pele de tilápia como biomaterial estéril, seguro e de longa duração, apto para aplicação clínica em ambientes hospitalares e veterinários.

As amostras do grupo glicerina mantiveram morfologia semelhante à da pele fresca de tilápia em todos os tempos avaliados, o que corrobora os achados de Alves et al. (2018). Esses autores observaram que a pele de tilápia submetida à preservação em glicerina, mesmo após o processo de reidratação, apresentou arquitetura histológica comparável à da pele in natura, evidenciando apenas discreta desorganização das fibras colágenas, sem significância clínica relevante. No presente estudo, além da preservação morfológica, as peles conservadas em glicerina também demonstraram manutenção das propriedades mecânicas, especialmente aos 90 dias, sendo o único grupo que apresentou resistência tensiométrica semelhante à da pele fresca nesse período. Esses resultados sugerem que a glicerina a 98% é um método eficaz e promissor para a conservação de pele de tilápia, sobretudo em períodos superiores a 60 dias,

quando os demais métodos começam a demonstrar declínio nas propriedades estruturais e biomecânicas.

Adicionalmente, a eficácia das técnicas de preservação testadas mostrou-se dependente do tempo de armazenamento. Embora todos os métodos tenham preservado as concentrações de colágeno tipo I e III por até 90 dias, conforme demonstrado pelas análises histoquímicas, apenas a glicerina manteve a integridade tecidual morfológica e funcional de maneira consistente durante todo o período. Essa estabilidade colagênica ao longo do tempo indica que os métodos utilizados não promoveram degradação significativa da matriz extracelular. A conservação adequada do colágeno é essencial para garantir a resistência mecânica e a biocompatibilidade da biomembrana, requisitos fundamentais para sua aplicação clínica como curativo biológico ou enxerto temporário.

Tais achados estão alinhados com os princípios da engenharia de tecidos, que preconizam a preservação estrutural e funcional dos biomateriais utilizados em procedimentos reparadores. A glicerina, além de suas propriedades antimicrobianas e desidratantes, atua como agente fixador que estabiliza proteínas e impede a autólise celular, contribuindo para a preservação da matriz colágena. Estudos recentes, como o de Gholipourmalekabadi et al. (2020), reforçam a segurança e eficácia da glicerina como meio de conservação de tecidos biológicos destinados à aplicação médica.

O preparo das amostras com clorexidina a 2%, associado aos diferentes métodos de conservação, mostrou-se eficaz na eliminação de contaminantes microbiológicos, visto que não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos períodos analisados (30, 60 e 90 dias). Esse resultado reforça a ação antimicrobiana de amplo espectro da clorexidina, eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, conforme já demonstrado por Ibrahim et al. (2020), que observaram redução significativa da microbiota em peles de tilápia tratadas com clorexidina

a 4%. O protocolo utilizado no presente estudo, envolvendo imersão, fricção periódica e enxágue, provavelmente contribuiu para a eliminação eficaz dos microrganismos contaminantes.

No que diz respeito às propriedades mecânicas, todos os métodos de preservação avaliados — solução salina hipersaturada, congelamento e glicerina — foram capazes de manter resistência à tração viável para aplicações clínicas, demonstrando que a integridade estrutural da pele foi preservada em diferentes graus. Entretanto, observou-se uma variação significativa na performance mecânica de acordo com o tempo de armazenamento. Aos 30 dias, o método de congelamento foi o mais eficaz, com desempenho tensiométrico semelhante ao da pele fresca, o que sugere que, nesse intervalo, o congelamento promove menor degradação estrutural do tecido conjuntivo denso. Por outro lado, aos 90 dias, a glicerina a 98% demonstrou superioridade, mantendo resistência mecânica comparável à do controle, além de preservar a morfologia histológica das amostras sem alterações significativas.

Acredita-se que os efeitos observados estejam relacionados às propriedades intrínsecas de cada método de conservação. O congelamento, ao impedir a atividade enzimática e bacteriana por meio da interrupção dos processos metabólicos celulares, é eficaz no curto prazo, mas pode induzir microfissuras e alterações colagenosas em períodos mais prolongados, especialmente quando realizado a -18 °C, como observado por Ling et al. (2023). A glicerina, além de ser um conservante higroscópico, atua como fixador biológico, mantendo a estrutura e função das proteínas da matriz extracelular por mais tempo, como demonstrado por Gholipourmalekabadi et al. (2020).

Portanto, a escolha do método de conservação deve considerar o tempo de armazenamento e o uso pretendido para o biomaterial, sendo o congelamento mais adequado

para períodos curtos e a glicerina recomendada para aplicações que demandem preservação prolongada com manutenção das características morfofuncionais do tecido.

As diferenças observadas na resistência mecânica das peles de tilápia não podem ser atribuídas às concentrações de colágeno tipo I e III, uma vez que a análise histoquímica com Picosírius Red não revelou variações significativas entre os grupos. No entanto, alterações morfológicas na disposição das fibras de colágeno, evidenciadas por cortes corados com hematoxilina e eosina, sugerem que a organização estrutural do tecido conjuntivo denso pode influenciar diretamente nas propriedades mecânicas do biomaterial. Estudos anteriores demonstraram que a pele de tilápia apresenta uma derme composta por feixes organizados de fibras de colágeno denso, predominantemente do tipo I, o que contribui para sua elevada resistência à tração. Alterações nesta organização, possivelmente induzidas pelos diferentes métodos de preservação, podem comprometer a integridade mecânica do tecido. Portanto, é fundamental que futuras pesquisas investiguem com maior profundidade os mecanismos pelos quais os métodos de conservação afetam a arquitetura das fibras colágenas, a fim de otimizar as técnicas de preservação e garantir a funcionalidade do biomaterial em aplicações clínicas.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a eficácia das técnicas de preservação da pele de tilápia varia de acordo com o tempo de armazenamento e com as características intrínsecas de cada método. No curto prazo (30 dias), o congelamento a -18 °C demonstrou ser o método mais eficaz, preservando as propriedades mecânicas da pele de forma semelhante à amostra fresca. Por outro lado, no longo prazo (90 dias), a glicerina a 98% destacou-se por manter não apenas a resistência mecânica, mas também a morfologia histológica e a estabilidade do colágeno, tornando-se a melhor alternativa entre os métodos testados para conservação prolongada.

REFERÊNCIAS

- AIUB PB & PASSINI Y. 2019. Uso de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em acidentes por queimadura em animais selvagens. B Apamvet. 29–31.
- ALONSO A, MEIRELLES NC, YUSHMANOV VE & TABAK M. 1996. Water Increases the Fluidity of Intercellular Membranes of Stratum Corneum: Correlation with Water Permeability, Elastic, and Electrical Resistance Properties. J Inv Derm 106(5): 1058–1063.
- ALVES A, et al. 2015. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. Rev Bras Queimaduras 14(3): 203–10
- ALVES APNN, et al. 2018. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. Cell Tissue Bank 19 (3):373–82
- ARUTYUNYAN I, ELCHANINOV A, SUKHIKH G & FATKHUDINOV T. 2021. Cryopreservation of Tissue-Engineered Scaffold-Based Constructs: From Concept to Reality. Stem Cell Rev Rep 18(4): 1234–1252.
- BADYLAK S, FREYTES D & GILBERT T. 2009. Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function. Acta Biomater 5 (1): 1–13.
- BARIANI F, LOPES GC, CRISCI AR, JUNIOR RF, SOUZA C & GREGÓRIO CORRÊA GUIMARÃES. 2014. Análise morfológica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em açúcar, glicerina, mel e sal. Vet Notícias 20(2).
- GRASIELA DE BASTIANI, ALINE, TAINÁ KUWER JACOBSEN, DE D, ADRIANO TONY RAMOS & ANDRÉ FONTANA GOETTEN. 2023. Comparação fotomicrográfica das fibras colágenas equinas da inserção proximal do músculo interósseo III. Res Society Dev 12(3): e12612340362.
- BEDOYA SAO, SOUZA MV, L.G. CONCEIÇÃO, VILORIA MIV, VALENTE FL, F.H. LOURES, MOREIRA JCL & COELHO PGB. 2019. Quantificação do colágeno dérmico equino por duas técnicas morfométricas: contagem de pontos e segmentação de cor. Arq bras med vet zootec 71(3): 761-769.

BORDIGNON AC, FRANCO MLR de S, GASPARINO E, YAJIMA EM, VESCO APD, VISENTAINER JV & MIKCHA JMG. 2012. Aproveitamento de peles de tilápia-do-nilo congeladas e salgadas para extração de gelatina em processo batelada. *Rev Bras Zootec* 41(3): 473–478.

BORGES DE MIRANDA MJ. 2018. Viabilidade da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico no tratamento de queimaduras. *Anais da Faculdade de Medicina de Olinda* 1 (1): 49–52.

BRUN MV, PIPPI NL, DREIMEIER D, CONTESINI EA, BECK CA de C, CUNHA O da, PINTO FILHO STL, ROEHSIG C & STEDILE R. 2002. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. *Ciência Rural* 32(6): 1019–1025.

BRUN MV, PIPPI NL, DRIEMEIER D, CONTESINI EA, BECK CA de C, CUNHA O da, PINTO FILHO STL, ROEHSIG C, STEDILE R & SILVA TF da. 2004. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. *Ciência Rural* 34(1): 147–153.

CAÑEDO-DORANTES L & CAÑEDO-AYALA M. 2019. Skin acute wound healing: A comprehensive review. *Int J Inflamm*. 2019:1–15.

CARDOSO LD. 2018. Avaliação histológica de cartilagens elásticas submetidas a diferentes processos de conservação e tratamento alcalino [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás.

COELHO PGB, SOUZA MV de, CONCEIÇÃO LG, VILORIA MIV & BEDOYA SAO. 2018. Evaluation of dermal collagen stained with Picosirius red and examined under polarized light microscopy. *An. Bras. Dermatol* 93: 415-418.

COSTA JQ. 2022. Tratamento de ferida aberta em cães com o uso de curativo biológico com pele de tilápia. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em medicina veterinária) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Paraíba.

DE SOUZA A, DE ALMEIDA CRUZ M, DE ARAÚJO TAT, PARISI JR, DO VALE GCA, DOS SANTOS JORGE SOUSA K, RIBEIRO DA, GRANITO RN & RENNO ACM. 2022. Fish collagen for skin wound healing: A systematic review in experimental animal studies. *Cell Tissue Res* 388(3): 489–502.

- FERNÁNDEZ-DIŞAZ MD, MONTERO P., GÓMEZ-GUILLÉN MC . 2003. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydro*, Lancaster 17(3): 281-286.
- GHOLIPOURMALEKABADI M, FARHADIHOSSEINABADI B, FARAJI M & NOURANI MR. 2019. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns Sep* 46(6): 1254-1271.
- GRANT CA, BROCKWELL DJ, RADFORD SE & THOMSON NH. 2009. Tuning the Elastic Modulus of Hydrated Collagen Fibrils. *Biophys J* 97: 2985–2992.
- HERMANS MHE. 2011. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial. *Burns* 37(5): 873–81.
- IBRAHIM A, HASSAN D, KELANY N, KOTB S & SOLIMAN M. 2020a. Assessment of Tilapia Skin Collagen for Biomedical Research Applications in Comparison with Mammalian Collagen. *Molecules* 29(2): 402.
- IBRAHIM A, HASSAN D, KELANY N, KOTB S & SOLIMAN M. 2020b. Validation of three different sterilization methods of tilapia skin dressing: Impact on microbiological enumeration and collagen content. *Front Vet Sci*. 7: 1–8.
- IBRAHIM A, FAHMY A, GHADA ABD-ELMONSEF MAHMOUD, SOLIMAN M & ELSHAHAWY AM. 2024. New strategies for sterilization and preservation of fresh fish skin grafts. *Sci Rep* 14 (1253).
- JUMLONGKUL J & TRAITHEPCHANAPAI P, 2017. Comparison between Formaldehyde and Salt Solutions for Preservation of Human Liver and Brain Slices. *Chula Med J* 61(1):17–30.
- KARAM RG, CURY FS, AMBRÓSIO CE & MANÇANARES CAF. 2016. Uso Da Glicerina Para a Substituição Do Formaldeído Na Conservação de Peças Anatômicas. *Pesq Vet Bras* 36(7): 671–675.
- KARIM AA, BHAT R. 2009. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll*. 23(3): 563–76.

- KOHLHAUSER M, LUZE H, NISCHWITZ SP & KAMOLZ LP. 2021. Historical evolution of skin grafting—A journey through time. *Medicina*. 57(4): 348.
- LIMA JUNIOR EM, BANDEIRA T de JPG, MIRANDA MJB de, FERREIRA GE, PARENTE EA, PICCOLO NS & DE MORAES FLHO MO. 2016. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*./ Caracterização da microbiota da pele e cavidade oral de *Oreochromis niloticus*. *J Heal Bio Sci* 4(3): 193–197.
- LIMA-JÚNIOR EM, et al. 2020. Lyophilised tilapia skin as a xenograft for superficial partial thickness burns: a novel preparation and storage technique. *J Wound Care* 29(10): 598–602.
- LING J, DU Y, SHENG Y, WANG W, WU H, CHEN G & LV H. 2023. Influence of Cryopreservation Methods of Ex Vivo Rat and Pig Skin on the Results of in Vitro Permeation Test. *Eur J Pharm Biopharm* 189: 109–121,
- LOUISELLE AE, NIEMIEC SM, ZGHEIB C & LIECHTY KW. 2021. Macrophage Polarization and Diabetic Wound Healing. *Transl Res* 236: 109–116.
- MACNEIL S. 2007. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 445(7130): 874–80.
- MOLINARI LM, SCOARIS DDO, PEDROSO RB, BITTENCOURT NDLR, NAKAMURA CV, NAKAMURA TU & ABREU FILHO BA de., DIAS FILHO BP. 2003. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. *Acta Sci Biol.Sci* 25(2): 267–271.
- MIGUEL SP, MOREIRA AF & CORREIA IJ. 2019. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *Int J Biol Macromol*. 127: 460–75.
- MIRANDA MJB & BRANDT CT. 2019. Nile tilapia skin xenograft versus silver-based hydrofiber dressing in the treatment of second-degree burns in adults. *Rev Bras Cir Plast (RBCP)* 34 (1): 89–95.
- NIE Y, CHEN J, XU J, ZHANG Y, YANG M, YANG L, WANG X & ZHONG J. 2022. Vacuum freeze-drying of tilapia skin affects the properties of skin and extracted gelatins. *Food Chem* 374: 131784.
- O'BRIEN FJ. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 14(3): 88–95.

PSICULTURA AB. 2023 - PeixeBR.. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario/>>.

RODRIGUES E. Pesquisa de Aeromonas spp. em tilápia (*Oreochromis niloticus*), cultivada no estado do Rio de Janeiro - Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana. 2007. 208 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

SU L, ZHENG J, WANG Y, ZHANG W & HU D. 2019. Emerging progress on the mechanism and technology in wound repair. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 117: 109191.

ANEXO 01 – Protocolo Comitê de Ética em Experimentação Animal.**Uniube**Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-084/2018

Uberaba, 12 de dezembro de 2018

Ilmo. Prof.

Renato Linhares Sampaio

Assunto: Encaminha processo nº 012/2018, sobre o protocolo de pesquisa "*Emprego da pele de tilápia preservada em glicerina a 98%, criopreservada e a fresco no tratamento de feridas cutâneas experimentais em coelhos: estudo in vitro e in vivo das características macroscópicas, microscópicas, microbiológicas e biomecânicas*".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 22/10/2018, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

Prof. Joely F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE