

ANÁLISE TOXICOLÓGICA IN VITRO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COM CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L-929)

¹SOPHIA MARTINS DA SILVA, ²MARIA DAS CANDEIAS SANTOS SILVA, ²FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES,
³CARLOS ROBERTO KOSCKY PAIER, ¹EDMAR MACIEL LIMA JÚNIOR, ¹MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO

¹Universidade Federal do Ceará (UFC), ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

³Centro de Tratamento de Queimados, Instituto Dr. José Frota (IJF)

<sofphia.jg@gmail.com>, <maria.candeias.santos07@aluno.ifce.edu.br>, <felipe.rocha@ifce.edu.br>, <carlos.paier@ufc.br>, <edmarmacie@gmail.com> <odorico@ufc.br>

DOI: 10.21439/conexoes.v19.3439

Resumo. O colágeno extraído e purificado da pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um valioso insumo que pode ser utilizado como biomaterial em aplicações mais sensíveis da medicina regenerativa, como cirurgias cardíacas e neurológicas. A avaliação toxicológica *in vitro* utilizando linhagem celular L-929 é de suma importância, pois garante integridade e segurança nos diversos usos pretendidos, evitando reações adversas do organismo aos dispositivos derivados. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do colágeno purificado extraído da pele de tilápia utilizando a linha celular L-929. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o colágeno purificado e o controle negativo. O grupo experimental é atóxico e foi aprovado pela ISO 10993-5:2009, demonstrando crescimento celular acima de 70%. Alta proliferação celular (acima de 100%) também foi observada em estudos *in vitro* e *in vivo* com pele fresca de tilápia. Possivelmente possui mecanismos de sinalização na cascata do processo cicatricial, resultando em população celular acelerada. Espera-se que outros estudos biomoleculares e experimentos *in vivo* possam elucidar essa característica biológica única do colágeno da pele da tilápia no processo de viabilidade celular

Palavras-chave: pele de tilápia; biocompatibilidade; citotoxicidade.

IN VITRO TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF COLLAGEN FROM THE SKIN OF TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) WITH MURINE FIBROBLAST CELLS (L-929)

Abstract. Collagen extracted and purified from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a valuable input that can be used as a biomaterial in more sensitive applications in regenerative medicine, such as cardiac and neurological surgeries. The *in vitro* toxicological evaluation of the L-929 cell line is of paramount importance, as it ensures integrity and safety in the various intended uses, preventing adverse reactions by the organism to the derived devices. This work aimed to evaluate the toxicity of purified collagen extracted from tilapia skin using the L-929 cell line. There was a statistically significant difference between purified collagen and the negative control. The experimental group is non-toxic and was approved by ISO 10993-5:2009, demonstrating cell growth above 70%. High cell proliferation (above 100%) was also observed *in vitro* and *in vivo* studies with fresh tilapia skin; as it possibly has signaling mechanisms in the healing process cascade, resulting in accelerated cell population. It is expected that further biomolecular studies and *in vivo* experiments can elucidate this unique biological characteristic of tilapia skin collagen in the process of cell viability.

Keywords: tilapia skin; biocompatibility; cytotoxicity.



1 INTRODUÇÃO

As queimaduras são uma das maiores agressões sofridas pelo nosso organismo (Park *et al.*, 2017). Trata-se de um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo (WHO, 2014). O uso de aloenxerto para substituto tecidual não supre a grande demanda. Uma alternativa à enxertia é o uso de dispositivos médicos derivados de tecidos animais (Badylak, 2007; Lobo *et al.*, 2014). Todavia, são de alto custo e pouca acessibilidade, excluindo muitos pacientes dos benefícios auferidos pelos modernos tratamentos de medicina regenerativa (Alves *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016).

Os dispositivos médicos devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e suas taxas de degradação devem coadunar com a taxa de crescimento e repovoamento celular dos tecidos a serem regenerados (Souza *et al.*, 2021). O colágeno de peixe tem sido estudado extensivamente como um biomaterial na regeneração de tecidos, por possuir características semelhantes ao colágeno de mamíferos, com menor risco de transmissão de zoonoses e sem restrições religiosas associadas, como é o caso de derivados bovinos e suínos em algumas regiões do mundo (Yamada *et al.*, 2014). Assim, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido utilizada como matéria-prima em novos dispositivos empregados no tratamento de lesões cutâneas, vaginoplastias e cirurgias de redesignação sexual (Lima-Júnior *et al.*, 2019; Monte *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2020).

Uma das razões para o sucesso da pele de tilápia em diferentes aplicações é seu alto teor de colágeno, de considerável relevância para o uso terapêutico (Alves, 2015). O mecanismo de cicatrização promovido pela cobertura de pele da tilápia ainda é desconhecido, porém indícios sugerem que o colágeno, isoladamente, é responsável por produzir um efeito cicatricial rápido (Costa *et al.*, 2017; Lima-Júnior *et al.*, 2020a). Os fibroblastos desempenham um papel crucial nesse processo, especialmente durante a fase proliferativa da cicatrização. Essas células migram para o local da lesão em resposta a sinais quimiotáticos, como fatores de crescimento (ex.: FGF e TGF- β) liberados por plaquetas, macrófagos e outras células inflamatórias. Uma vez no local, os fibroblastos sintetizam e secretam componentes essenciais da matriz extracelular (MEC), como colágeno tipo I e III, fibronectina e proteoglicanos, promovendo a formação do tecido de granulação. Além disso, eles se diferenciam em miofibroblastos, células especializadas na contração da ferida, contribuindo para a redução de sua área (Raju *et al.*, 2020). O colágeno extraído e purificado da pele desse peixe é um insumo valioso, que pode ser empregado no desenvolvimento de novos biomateriais úteis à medicina regenerativa (Lima-Júnior *et al.*, 2019; Gomes, 2021). Aplicações mais sensíveis demandam esterilização prévia do colágeno, como bioimpressão 3D e membranas para as cirurgias cardíacas e neurológicas (Souza *et al.*, 2021; Gomes, 2021). Promover a liberação controlada do colágeno e potencializar o processo cicatricial é essencial para a cura.

Para atender os critérios de um bom material para uso clínico são necessários testes pré-clínicos que garantam a ausência de rejeição e baixo potencial inflamatório (Mosmann, 1983; International Standard, 2009). Os órgãos de regulamentação recomendam e garantem a segurança de dispositivos biomédicos por meio dos testes de biocompatibilidade em modelos *in vitro* utilizando células de fibroblastos murino, seguindo a normativa da International Organization for Standardization (ISO) 10993-5:2009, que estabelece os procedimentos para a avaliação citotóxica de dispositivos médicos, demonstrando que um material pode ser considerado biocompatível e atóxico se apresentar uma viabilidade celular igual ou superior a 70% em testes quantitativos de crescimento celular, que garante a sua classificação como um biomaterial atóxico (Gruber; Nickel, 2023).

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a biocompatibilidade do colágeno da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus* - Linnaeus, 1758) utilizando a linhagem celular L-929.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extração, purificação, liofilização e esterilização do colágeno da pele de tilápia

Inicialmente, as peles de tilápia foram obtidas na piscicultura e realizada a limpeza inicial. Em seguida, as peles foram submetidas ao protocolo de extração, refinamento e alta purificação do colágeno pela preparação de uma biomembrana de camada única adaptado pelo método proposto por Nalinaon *et al.* (2010) (Figura 1). Todo o processo de extração é executado sob refrigeração e agitação a 4°C.

Foram retiradas as proteínas não colagenosas, lipídios e compostos hidrofóbicos das peles de tilápia por meio de incubações sucessivas com trocas de volume, utilizando solução básica (hidróxido de sódio) 0,1 mol/L (m/v), lavagens com água ultrapura e solução surfactante de Tween-20 0,05% (v/v). Em seguida, foi realizada a extração de Colágeno Solubilizado por Ácido acético 0,5 mol/L (m/v) (CSA) por 24–36 h, seguida da centrifugação e coleta

ANÁLISE TOXICOLÓGICA IN VITRO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COM CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L-929)

Figura 1: Etapas do processo de purificação do colágeno extraído da pele de tilapia.



Fonte: Imagem do autor.

do sobrenadante; o procedimento foi repetido mais uma vez. Após as duas extrações, ambos os sobrenadantes foram submetidos à precipitação salina (*salting-out*) de CSA, misturados e incubados para um tampão final 2,6 mol/L (m/v) pela adição de Cloreto de Sódio (NaCl) e Tris Base com Ácido Clorídrico (TRIS-HCl) pH 7.5; e, em seguida, centrifugado. O precipitado do CSA foi solubilizado em solução ácida e dissolvido em solução com ácido acético (m/v). A ressolubilização do CSA foi realizada por diálise em sucessivos volumes contra solução ácida fraca e contra água ultrapura por 72 h. O gel dializado obtido na fase anterior foi armazenado no -80°C por 16 h, em seguida, liofilizado em aparelho Liotop 108 (Liobrás, São Carlos, SP) para a formação de uma esponja de colágeno (IBARZ, 1999). Posteriormente, o material foi recolhido e levado para uma câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe B2), onde foi esterilizado utilizando radiação ultravioleta por um período de 24 h. Esse processo está descrito e validado na patente depositada no INPI com o número BR1020180735071A2 (Lima-Júnior *et al.*, 2018).

2.2 Ensaio de citotoxicidade

A linhagem L-929 derivada de fibroblasto murino foi cultivada em garrafas de cultura de células usando meio DMEM (Gibco), com suplementação de soro fetal bovino (SFB) e tratamento de antibiótico. A atividade toxicológica foi verificada por meio do teste do MTT. Nesse ensaio, a atividade mitocondrial das células é constante, sendo refletida pela conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan, que podem ser solubilizados em DMSO para quantificação por absorbância em espectrofotômetro (Mosmann, 1983).

Seguindo a normativa ISO 10993-5-2009, a linhagem L-929 foi plaqueada na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL em multiplacas de 96 poços. Em seguida, as amostras foram incubadas em contato com meio de cultura DMEM para obtenção dos meios ou extratos (amostras testes). Tanto a placa quanto os extratos foram incubados por 24 h de incubação em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 24 h, o meio das células foi removido e adicionados 100 μL do extrato previamente preparado (amostra teste), e, em seguida, as placas foram incubadas novamente por 24 h. Todas as amostras foram observadas e analisadas ao microscópio invertido após 24 h de contato com o extrato obtido dos biomateriais. Ao término deste tempo, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante retirado. Em cada poço foram adicionados solução de MTT (1 mg/mL), diluído em meio DMEM sem vermelho fenol (Gibco), e as placas foram reincubadas por 3 h. Após o período de incubação, as placas foram novamente centrifugadas

ANÁLISE TOXICOLÓGICA IN VITRO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COM CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L-929)

e o sobrenadante retirado. Em seguida, foram adicionados em cada poço 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar o formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) no comprimento de onda de 570 nm. Para a leitura, foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

Foram realizadas três repetições técnicas, calculadas as médias e comparadas pelo teste de ANOVA de um fator com pós-teste de Bonferroni (nível de significância de 5%). Para a análise dos dados, foi utilizado o software *GraphPad Prism*[®] versão 5.00 para *Windows*[®] (*GraphPad Software*, San Diego, California, USA, 2007). Os valores das absorbâncias resultantes dos testes do extrato em concentração única (100%) foram transformados em porcentagem de inibição e comparados ao controle negativo (células incubadas com meio de cultura DMEM).

3 RESULTADOS

A normativa ISO 10993-5:2009 estabelece o teste de citotoxicidade de dispositivos médicos para análise da biocompatibilidade celular. Segundo a normativa, neste ensaio foi analisada a viabilidade de crescimento das células como avaliação citotóxica quantitativa.

Os dados foram expressos em média \pm EPM (Erro Padrão da Média) dos percentuais da triplicata do grupo teste (colágeno purificado) e controle negativo (células incubadas em meio de cultura DMEM) após 24 h de contato celular. O controle negativo apresentou a viabilidade de $100\% \pm 1,39$ (ver Tabela 1), e o extrato do colágeno apresentou potencial de crescimento celular acima do controle.

Tabela 1: Viabilidade celular (%) do colágeno purificado extraído da pele de tilápia

Viabilidade celular (%) pelo ensaio do MTT segundo a ISO 10993-5	
Grupos	Média \pm EPM
Controle negativo (células incubadas com meio de cultura DMEM)	$100,0 \pm 1,39$
Colágeno purificado extraído de pele de tilápia	$110,9 \pm 1,73$

Fonte: Dados do experimento.

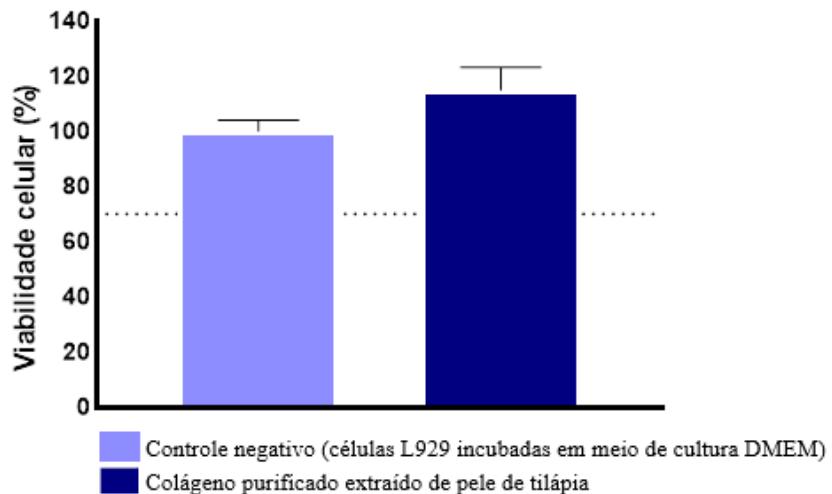
Os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas na concentração testada (dose única, 100%). Os resultados demonstraram viabilidade celular e aprovação do colágeno purificado como um biomaterial atóxico, segundo o protocolo da ISO 10993-5:2009, em relação à proliferação celular (acima de 70%) (ver Figura 2).

4 DISCUSSÃO

O teste de citotoxicidade *in vitro* é uma etapa inicial e imprescindível, pois garante que o organismo que receberá a implantação de dispositivos médicos não sofra reações adversas (Mosmann (1983); Oliveira *et al.*, 2019; Sciani *et al.*, 2013). Nesse estudo, o uso de células de mamíferos (fibroblasto murino) atende aos requisitos do grau de cultura de tecidos e adequa-se ao uso da normativa da ISO 10993-5:2009. Quando em contato com células de fibroblasto, foi possível verificar a excelente atividade biológica da membrana de colágeno purificado; pois, quanto mais similares as condições biológicas forem ao uso clínico, melhores são as possibilidades de determinar o perfil toxicológico do biomaterial (Greenhalgh, 2005). Logo, a linhagem utilizada são células residentes nos tecidos e responsáveis pela produção de colágeno. No processo de cicatrização, os fibroblastos promovem a remodelação dos tecidos. De forma orquestrada, a grande quantidade de colágeno purificado oriundo da pele de tilápia demonstrou estimular fatores de crescimento dos fibroblastos, sendo essencial para um oportuno reparo tecidual (Gomes, 2021; Soares, 2022).

O estudo apresenta resultados promissores mediante a alta biocompatibilidade do colágeno purificado extraído da pele de tilápia *in natura*, quando em contato celular. O colágeno é um insumo valioso; logo, já se vislumbra seu uso em áreas específicas da medicina regenerativa, como membranas para cirurgias cardíacas e neurológicas (Oliveira, 2020). Nos estudos de Lima-Júnior *et al.* (2019) com a pele de tilápia liofilizada foi demonstrado uma excelente cicatrização tecidual em lesões de queimaduras tanto em testes pré-clínicos e clínicos. Os excelentes

Figura 2: Viabilidade celular do colágeno purificado extraído da pele de tilapia.



Fonte: Dados do experimento.

resultados apresentaram o curativo biológico como uma alternativa promissora para enxertia em pacientes queimados. Corroborando com nossos estudos, a excelente oclusão ao leito das feridas e rápido processo cicatricial são advindos da riqueza de colágeno presente na derme do peixe (Alves *et al.*, 2018).

O colágeno purificado extraído da pele de tilapia demonstrou um aumento significativo na viabilidade celular *in vitro*, sugerindo uma possível relação com os mecanismos envolvidos no processo de cicatrização observados em aplicações da pele liofilizada em queimaduras (Lima-Júnior *et al.*, 2020b). A viabilidade celular foi medida em comparação a um controle negativo, definido como células L929 incubadas em meio de cultura padrão (DMEM), cuja viabilidade foi estabelecida como 100%. Esse valor de referência representa a condição basal de sobrevivência celular, sem interferências externas. Observou-se, no entanto, que o colágeno purificado promoveu um aumento acima de 100%, indicando que não apenas manteve a sobrevivência celular, mas também estimulou a proliferação celular em níveis superiores ao esperado em condições normais. Esse resultado sugere a presença de biomoléculas bioativas no colágeno purificado, capazes de ativar vias celulares associadas à proliferação e reparação tecidual. Estudos iniciais apontam que o colágeno purificado pode desencadear uma cascata de eventos bioquímicos, envolvendo fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras, que favorecem o crescimento exponencial das células em cultura (Alves, 2015; Costa *et al.*, 2017; Macedo, 2021; Gomes, 2021). Esse achado reforça o potencial terapêutico do colágeno de tilapia como um insumo valioso na medicina regenerativa, com aplicações promissoras no reparo tecidual.

Sabe-se que a ação inflamatória é potencializada com o uso de biomateriais a base de colágeno, sendo inúmeras as vantagens associadas, a citar o período de cicatrização curto, neovascularização e a organização das células da pele na formação do tecido cicatrizado (Basha; Kumar; Doble, 2015; Jacob *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2017; Rahimnejad; Derakhshanfar; Zhong, 2017; Salgado *et al.*, 2016).

A toxicidade do colágeno extraído e purificado da pele de tilapia demonstra perspectivas promissoras, pois estima-se que aproximadamente 3% da população possuam algum tipo de reação alérgica ao colágeno de fonte de animais terrestres (Justino, 2021). Estudos clínicos de irritabilidade cutânea da pele de tilapia *in natura* demonstram que não houve significante reação na pele dos sujeitos de pesquisa saudáveis (Lima-Júnior *et al.*, 2020a). Assim, essa ausência de toxicidade corrobora com esses testes citotóxicos com o coproduto (colágeno purificado) (Lima-Júnior *et al.*, 2019). Com excelência, quando em contato celular, o extrato do colágeno demonstrou células metabolicamente ativas superiores a 70%, sendo aprovado pela normativa ISO 10993-5; propriedades atribuídas a um bom biomaterial (Fernández-Segovia *et al.*, 2014).

A perspectiva é que os biomateriais advindos do colágeno purificado sofram biodegradação gradual ao longo de um período de tempo, condizente com a velocidade da formação do tecido, permitindo que o tecido regenerado o substitua (Ribeiro *et al.*, 2017). Estudos com nanofibras biomiméticas de colágeno de tilapia demonstram a

ANÁLISE TOXICOLÓGICA IN VITRO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COM CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L-929)

capacidade de promover efeitos curativos por meio de indução da diferenciação de queratinócitos e através da síntese de colágeno de fibroblasto da pele (Zhou *et al.*, 2015). O contato *in vitro* com células de fibroblasto (L-929) possibilitou identificarmos essa biocompatibilidade celular. Todavia, é importante ressaltar que os modelos *in vitro* não conseguem imitar ainda o ambiente biológico do processo; estes são projetados para responder a questões específicas que envolvem um ou dois tipos de células em resposta a alguns estímulos (Greenhalgh, 2005). Daí a importância e a necessidade de usar um modelo capaz de elucidar o processo de cicatrização na pele humana com o uso da membrana de colágeno purificado em estudos futuros.

Biomateriais à base de colágeno são a grande urgência na clínica para potencializar o processo de reparo tecidual (Crispin, 2021). A excelente aceitação dos produtos oriundos da pele de tilápia impulsiona a exploração do coproduto, o colágeno purificado. Os estudos futuros com o colágeno isolado em modelos *in vivo* elucidarão o comportamento biológico dessa proteína em ação de reparo tecidual no processo inflamatório.

5 CONCLUSÕES

A avaliação da atividade citotóxica demonstrou que o colágeno purificado extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) é não tóxico, possuindo excelente biocompatibilidade na linhagem celular L-929 (fibroblasto murino), seguindo a normativa da ISO 10993:5. É um grande avanço para o desenvolvimento de coprodutos à base de colágeno oriundo da pele de tilápia para diversas aplicabilidades na medicina regenerativa. Demais estudos biomoleculares elucidarão os biomarcadores responsáveis pela cascata de crescimento celular acelerado em resposta ao contato com o extrato da esponja de colágeno, além de esclarecer sua ação biológica em modelos *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a orientação do professor Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *campus* Jaguaribe e o apoio do coordenador geral da pesquisa do Projeto Pele de Tilápia, Dr. Edmar Maciel Lima Júnior. Também agradece ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela parceria financeira para o desenvolvimento de ensaios experimentais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. P. N. N. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Limeira, v. 14, n. 3, p. 203–210, 2015.
- ALVES, A. P. N. N. *et al.* Study of tensiometric properties, microbiological and collagen cellular in nile tilápia skin submitted to cellular sterilization methods. **Cell Tissue Bank**, v. 19, n. 3, p. 373–382, 2018.
- COSTA, B. A. *et al.* Avaliação da redução do uso de analgésicos por pacientes ambulatoriais de um centro de queimados de referência em Fortaleza com a aplicação da pele de tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras de segundo grau superficial. In: **XXXVI Encontro de Iniciação Científica. Encontros Universitários da UFC**. Fortaleza: CE, 2017.
- CRISPIN, L. A. C. **Importância da atividade secretora de macrófagos induzida pela crotoxina sobre as funções de fibroblastos envolvidas com o processo de cicatrização**. Tese (Tese (Doutorado)) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.
- GHASEMI, M. *et al.* O ensaio mtt: Utilidade, limitações, armadilhas e interpretação em análises em massa e de células únicas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.
- GOMES, J. P. **Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 75 f. p. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Farmacologia) — Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- GREENHALGH, D. Models of wound healing. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, p. 293–305, July/August 2005.
- GRUBER, S.; NICKEL, A. Tóxico ou não tóxico? As especificações da norma ISO 10993-5 não são explícitas o suficiente para produzir resultados comparáveis na avaliação de citotoxicidade de um dispositivo médico idêntico. **Frontiers in Medical Technology**, v. 5, p. 1195529, 2023.
- HUSSEY, G. S.; DZIKI, J. L.; BADYLAK, S. F. Materiais baseados em matriz extracelular para medicina regenerativa. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 7, p. 159–173, 2018.
- IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Operaciones unitarias de la ingeniería de alimentos**. Lancaster: Technomic Publishing, 1999.
- International Standard. **Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods**. 2009. ISO 10993-5.
- JACOB, J. *et al.* Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, n. 1, p. 1–11, 2018.
- JUSTINO, M. A. **Extração e caracterização de colágeno de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*): Avaliação do seu potencial na formulação de hidrogéis para medicina regenerativa**. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, 2021.
- KIM, H. S. *et al.* Sistemas avançados de administração de medicamentos e enxertos de pele artificial para cicatrização de feridas cutâneas. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 146, p. 209–239, 2019.
- E. M. Lima-Júnior *et al.* **Processo de extração de colágeno tipo I da pele de tilápia e uso do colágeno tipo I produzido da pele de tilápia**. 2018. INPI BR1020180735071A2.
- LIMA-JÚNIOR, E. M. *et al.* Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical Case Reports**, 2019.
- LIMA-JÚNIOR, E. M. *et al.* Innovative burn treatment using tilapia skin as a xenograft: A phase II randomized controlled trial. **Journal of Burn Care & Research**, 2020.
- LIMA-JÚNIOR, E. M. *et al.* Tratamento de queimaduras de segundo grau profundo em abdômen, coxas e genitália: Uso da pele de tilápia como um xenoenxerto. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, 2020.
- MACEDO, F. S. **Curativo pele da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) modula a fase inflamatória e proliferativa da cicatrização de queimaduras superficiais em camundongos**. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Farmacologia) — Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- MANFREDI, G. G. P. **Utilização de pele de tilápia para o reparo e proteção do palato após remoção de**

ANÁLISE TOXICOLÓGICA IN VITRO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COM CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L-929)

- enxertos.** Tese (Tese de Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2021.
- MIRANDA, M. J. B. D. Viabilidade da pele de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico no tratamento de queimaduras: revisão da literatura. **Anais da Faculdade de Medicina de Olinda**, v. 1, n. 1, p. 49–52, 2018.
- MONTE, T. M. *et al.* Reconstrução da mão apert com pele de tilápia. **Revista de Cirurgia Craniofacial**, v. 33, n. 6, p. 1939, 2022.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.
- NALINAON, S. *et al.* Collagens from the skin of arabesque greenling (pleurogrammus azonus) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (thunnus alalunga) stomach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Bangkok, v. 90, n. 2010, p. 1492–1500, jan./abr. 2010.
- PARK, O. *et al.* Recent studies on micro-/nano-sized biomaterials for cancer immunotherapy. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 11–18, 2017.
- RAJU, R. *et al.* Role of fibroblast and macrophage in wound healing process — A critical review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 8, p. 5070–5083, 2020.
- RIBEIRO, J. C. V. *et al.* Versatility of chitosan-based biomaterials and their use as scaffolds for tissue regeneration. **Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.
- RODRÍGUEZ, A. H. *et al.* Cirurgia de afirmação de gênero de macho para fêmea usando pele de peixe tilápia do nilo como enxerto biocompatível. **Revista de Ginecologia Minimamente Invasiva**, v. 27, n. 7, p. 1474–1475, 2020.
- SALGADO, C. L. *et al.* Biodegradation, biocompatibility, and osteoconduction evaluation of collagen-nanohydroxyapatite cryogels for bone tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 1, p. 57–70, 2016.
- SILVA, S. M. D. *et al.* Biocompatibilidade da membrana de colágeno extraído de pele de tilápia. **Ciência Animal**, v. 34, n. 2, p. 52–62, 2024.
- SOARES, G. C. Avaliação do potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do nilo**
- em úlceras traumáticas de mucosa jugal em ratos.** Dissertação (Dissertação de Mestrado em Odontologia) — Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- Sociedade Brasileira de Queimaduras. **BSQ**. 2014. Disponível em: <http://rbqueimaduras.org.br/details/202/pt-BR>.
- SOUZA, P. D. *et al.* A biologia da proliferação fibroblástica: A excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28989–29010, 2021.
- TOZETTO, R. *et al.* Estudo das propriedades antioxidantes, antimicrobianas e cicatrizantes de extrato hidrolisado bruto da pele de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 11, p. e202300863, 2023.
- WANG, J. *et al.* Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: New insight into the antimicrobial action of silver. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2016.
- WHO. **Burns**. World Health Organization: Online, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>.
- YAMADA, S. *et al.* Potência do colágeno de peixe como um andaime para a medicina regenerativa. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- ZHOU, T. *et al.* Desenvolvimento de nanofibras biomiméticas de colágeno de tilápia para regeneração da pele através da indução da diferenciação de queratinócitos e síntese de colágeno de fibroblastos dérmicos. **Materiais e Interfaces Aplicadas ACS**, v. 7, n. 5, p. 3253–3262, 2015.