



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

**Aproveitamento dos resíduos de abate de animais: sulfato de condroitina obtido de cartilagem de animais na saúde humana e do fosfato de cálcio bifásico (BCP) extraído de ossos de peixe na regeneração óssea.**

**CECILIA VALENTE RODRIGUES TRUITE**

Maringá

2021

**CECILIA VALENTE RODRIGUES TRUITE**

**Aproveitamento dos resíduos de abate de animais: sulfato de condroitina obtido de cartilagem de animais na saúde humana e do fosfato de cálcio bifásico (BCP) extraído de ossos de peixe na regeneração óssea.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Maringá

2021

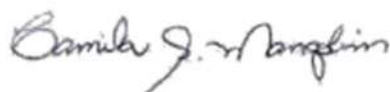
Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

T866a	<p>Truite, Cecilia Valente Rodrigues</p> <p>Aproveitamento dos resíduos de abate de animais : sulfato de condroitina obtido de cartilagem de animais na saúde humana e do fosfato de cálcio bifásico (BCP) extraído de ossos de peixe na regeneração óssea / Cecilia Valente Rodrigues Truite. -- Maringá, PR, 2021.</p> <p>58 f.: il. color., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Graciete Matioli.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2021.</p> <p>1. Resíduos agroindustriais. 2. Resíduos de animais - Reaproveitamento. 3. Sulfato de condroitina. 4. Beta-ciclodextrina. 5. Regeneração óssea. I. Matioli, Graciete, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.</p>
CDD 23.ed. 628.7466	

CECILIA VALENTE RODRIGUES TRUITE

**"APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DE ABATE DE ANIMAIS: SULFATO DE CONDROITINA OBTIDO DE CARTILAGEM DE AVES E SUÍNOS NA SAÚDE HUMANA E DO FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO (BCP) EXTRAÍDO DE OSSOS DE PEIXE NA REGENERAÇÃO ÓSSEA"**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Camila Sampaio Mangolim



Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinard



Profa. Dra. Luzmarina Hernandes



Prof. Dra. Francielle Sato

GRACIETTE  
MATIOLI:60668989904

Assinado de forma digital por  
GRACIETTE MATIOLI:60668989904  
Data: 2021.12.13 13:51:53 -03'00'

Profa. Dra. Graciette Matioli  
Orientadora

Maringá – 2021

**Orientadora:**

Profa. Dra. Graciette Matioli

## **BIOGRAFIA**

Cecilia Valente Rodrigues Truite nasceu no dia 31 de janeiro de 1977, na cidade de Maringá, Paraná, Brasil. Possui graduação em Farmácia Industrial pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Tem experiência na área de manipulação magistral, pesquisa de materiais científicos para o desenvolvimento de materiais para visitação médica e controle e gestão da qualidade em indústria de dispositivos médicos.

***Dedico***

*Aos meus pais Sandra Valente Truite e Oswaldo Rodrigues Truite (in memoriam) e ao meu companheiro Alison Ricardo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais, Sandra e Oswaldo (*in memoriam*), pelo amor, compreensão, conselhos e incentivos, confiança e acima de tudo pelo apoio e esforços empregados para que fosse possível a realização desta etapa da minha vida.

Ao meu companheiro, Alison, que me apoiou e incentivou durante o desenvolvimento do projeto.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Graciette Matioli, agradeço pela oportunidade, por todo o conhecimento transmitido, apoio, compreensão, paciência, orientação e amizade que possibilitaram o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Profa Dra Luzmarina Hernandes, obrigada pela dedicação, confiança, paciência e por todo o conhecimento transmitido.

Ao professor Dr. Wilson Ricardo Weinand, pela confecção dos materiais, pela paciência e por estar sempre disponível para discutir as dúvidas.

À amiga e companheira de projeto, Jessica Nayara, por tornar essa caminhada mais agradável, sempre presente em todos os momentos, dividindo as alegrias e tristezas da pós-graduação.

À professora Dra. Francielle Sato e as colegas do Laboratório de Física, Raquel e Adriane, pelo apoio, incentivos, desenvolvimento das análises e discussões sobre os resultados obtidos.

Às técnicas Maria Ângela, Silvia e Ana Paula do Laboratório de Histotécnica Animal, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa, e a todos os colegas e amigos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Enzimática, Hâmara, Tiele, Juliana, Vanderson, Nathália, Marília, Carolina, Camila, Thamara e Richard por todo carinho, amizade, auxílio e incentivos.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos membros titulares e suplentes da banca pela disponibilidade e contribuição para a melhoria deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que auxiliaram na realização deste trabalho, o meu sincero obrigada!



## APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está apresentada na forma de um artigo científico e um capítulo de livro, descritos a seguir.

1. Cecilia Valente Rodrigues Truite; Jessica Nayara Gimenez; Gabriela de Castro Prado; Leonardo Niero Santos; Raquel da Silva Palácios; Adriane do Nascimento; Eduardo Azzolini Volnistem; Thamara Thaiane da Silva Crozatti; Carolina Pereira Francisco; Francielle Sato; Wilson Ricardo Weinand; Luzmarina Hernandez; Graciette Matioli. **Bioperformance Studies of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds Extracted from Fish Bones Impregnated with Free Curcumin and Complexed with B-Cyclodextrin in Bone Regeneration.** Artigo publicação no periódico Biomolecules. Fator de impacto: 4,879, com classificação A1 no Qualis Único-Capes. [doi.org/10.3390/biom12030383]

2. Cecilia Valente Rodrigues Truite, Hâmara Milaneze de Souza, Tiele Carina de Oliveira Delani, Graciette Matioli. **Sulfato de condroitina: obtenção a partir de resíduos das agroindústrias e seus benefícios para a saúde humana.** Artigo de revisão publicado como capítulo de livro no e-book “Compostos Bioativos e suas aplicações” pela editora Mérida Publishers, 2021, cap. 6, p. 132-156. [ISBN: 978-65-994457-7-4] e [https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-7-4.c6]

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Agribusinesses produce large amounts of waste that, if not managed correctly, can lead to a number of impacts, both environmentally and in terms of public health. The processing of these residues is a great opportunity to develop by-products, transforming them into other marketable products. According to the Brazilian Animal Recycling Association (ABRA), in 2020 Brazil processed more than 13 million tons of bovine, porcine, and poultry and fishes' by-products, using mainly animal tissue trimmings, cartilage, tallow, and bones. The processing of the cartilage of birds, fishes and most mammals can extract chondroitin sulfate (CS), product widely used in the medicine, food, and cosmetics industries, among others. The carcasses and fish bones can be used to produce calcium phosphate-based bioceramics, with excellent bioperformance for bone regeneration. To further improve its bioactivity in bone regeneration, it can be enriched with other types of substances with osteogenic properties, such as curcumin, that in addition to properties like anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities, can stimulate the differentiation and mineralization of bone cells, preventing the deterioration of the bone structure, with beneficial changes in bone regeneration and growth. To improve its bioavailability, curcumin can be complexed with  $\beta$ -CD ( $\beta$ -cyclodextrin), which promotes its controlled release, enhancing its biological effects and maintaining its pharmacological properties.

**OBJECTIVES:** The objective of this research was to outline the importance of the use of animal slaughterhouse waste in reducing the negative impact on the environment and in its transformation into other marketable products, which can generate highly profitable products for the industry. Among these products, CS was studied, which can be obtained from poultry and swine by-products, providing several health benefits. Moreover, the physicochemical and structural properties of BCP (biphasic calcium phosphate) extracted from Nile Tilapia bones and its scaffold were evaluated. With the intention of evaluating whether the presence of free curcumin and complexed with  $\beta$ -CD associated with BCP improves the performance of the material, its bioactivity was studied in *in vitro* tests and, in *in vivo* tests in critical size defects in the calvaria of rats, it was evaluated its ability to promote additional effect to BCP in bone regeneration.

**MATERIALS AND METHODS:** A review study was carried out on the use of residues generated by agribusiness and its impact on the environment, especially CS and its benefits, in order to characterize them and discuss their various health benefits. In the other article, bone waste of Nile Tilapia was used in the production of calcium phosphate-based bioceramics, with an effect on bone regeneration. After production of the BCP scaffolds, the powder was characterized using the FTIR (Fourier transform infrared reflectance) and micro-Raman methodologies, besides the morphology evaluated by SEM (scanning electron microscopy) and particle size. XRD (X-ray diffraction) analysis and Rietveld refinement were used to quantify the crystalline phases present in the BCP. The pores of the scaffolds were evaluated by SEM. Subsequently, the complexation of curcumin with  $\beta$ -CD was performed and the scaffolds were impregnated with free curcumin and complexed with  $\beta$ -CD. For the *in vitro* studies, the SBF (Simulated Body Fluid) test was performed, and the changes, after 28 days of immersion in SBF, were observed in SEM and EDS (energy dispersive X-ray detector) in three groups: biphasic calcium phosphate (BCP), with free curcumin (BCP-CL) and complexed with  $\beta$ -CD (BCP-CD). A 60-day *in vivo* bone regeneration study was conducted, performing histological analysis to evaluate

morphological changes and micro-Raman analysis to evaluate the absorption of the phases of materials in different groups and time of implantation (15, 30, 45 and 60 days).

**RESULTS AND DISCUSSION:** Animal waste from poultry and porcine slaughterhouses can generate a series of environmental and public health impacts. Recycling is the best destination, since this waste can be transformed into high value-added commercial products, such as CS, which is a natural polymer, water-soluble, consisting of repeated chains of mucopolysaccharides. The CS shows benefits in several diseases, both alone and in combination with other active substances. Evidences show these benefits in bone repair, in the treatment of osteoarthritis, in cataract surgery in ophthalmology, besides its antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties. In the esthetics field, it can be used in skin tissue engineering, with positive effects in facial rejuvenation, besides its use in nanotechnology, acting in the controlled distribution of drugs. Regarding the second article, when evaluating biomaterials extracted from fish bones (Nile Tilapia), the results showed that BCP is composed of 57.2% HAp (hydroxyapatite) and 42.8%  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -tricalcium phosphate) and the Ca/P molar ratio corresponded to 1.59. The scaffolds showed open porosity of 57.21%, with a presence of macro and microporosity, and porous interconnectivity. FTIR analysis showed the functional groups  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{OH}^-$  present in the BCP bioceramic. Micro-Raman showed the peaks referring HAp and  $\beta$ -TCP, with the band at  $962\text{ cm}^{-1}$  being characteristic of the HAp phase, while those located at  $952$  and  $972\text{ cm}^{-1}$  are attributed to the  $\beta$ -TCP phase. In the SBF analysis, the occurrence of nucleation (precipitation) of an apatite layer was observed on the surface of the three samples analyzed (BCP, BCP-CL and BCP-CD), with similar characteristics and showing the bioactivity of the materials evaluated. The micro-Raman analysis, after implantation in the rat calvaria, showed a reduction throughout the study period of the  $\beta$ -TCP phase. When the groups were compared to each other, the BCP group showed a pronounced decrease of the  $\beta$ -TCP band until the 30-day period after implantation, with the greatest reduction in the first 15 days. In the BCP-CL and BCP-CD groups, the decay of  $\beta$ -TCP absorption bands was less accentuated over time. In the morphological analysis, there was a higher frequency of pores filled with bone tissue in varying degrees of differentiation after 60 days of study, but with similar characteristics between the groups, with BCP-CL and BCP-CD showing no additional action of free curcumin or complexed with  $\beta$ -CD on bone regeneration.

**CONCLUSION:** Agro-industrial wastes have been the target of studies for several years, and research has been conducted with the purpose of finding conscious and responsible means for the use of these materials. From an environmental point of view, reducing the impact caused by waste is considered of high importance, thus improving the environment and minimizing the accumulation of waste in the ecosystem. The CS is a widely used and profitable asset for industries that provides relevant benefits for human health and is the result of the use of animal slaughterhouse waste, providing a reduction of the negative impact on the environment. Fish bones, like from the Nile tilapia, are an excellent source for obtaining and producing natural bioceramics. The BCP used presented the physical-chemical and structural characteristics for a good biomaterial. After impregnation of BCP with free curcumin and complexed with  $\beta$ -CD, the materials showed the ability to induce bone-like apatite crystallization *in vitro*, with results similar to control BCP. *In vivo* analysis showed that the incorporation of curcumin, mainly from the complexed with  $\beta$ -CD, prolonged release of the  $\beta$ -TCP phase. This result appears an interesting feature for bone tissue engineering, being an alternative for the development of a prolonged release system of  $\beta$ -TCP phase.

Keywords:  $\beta$ -cyclodextrin; Biomaterials; Cartilage; Curcumin; Biphasic calcium phosphate; Osteoarthritis; Materials engineering; Recycling, Agroindustrial waste, Bone regeneration; Chondroitin sulfate.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO:** As agroindústrias produzem grandes quantidades de resíduos que, se não geridos corretamente, podem suscitar uma série de impactos, tanto ambientais como de saúde pública. O beneficiamento e processamento desses resíduos mostram-se como uma grande oportunidade de desenvolvimento de subprodutos, transformando-os em outros produtos comercializáveis. Segundo a Associação Brasileira de Reciclagem Animal (ABRA), em 2020 o Brasil processou mais de 13 milhões de toneladas de resíduos bovinos, suínos e subprodutos de aves e peixes, sendo aproveitados, principalmente, aparas de tecidos animais, cartilagens, sebo e ossos. O processamento da cartilagens de aves, peixes e maioria dos mamíferos pode-se extrair o sulfato de condroitina (SC), produto largamente utilizado na indústria de medicamentos, alimentos, cosméticos, entre outros. As carcaças e ossos de peixes podem ser aproveitados na produção de biocerâmicas a base de fosfato de cálcio, com excelente bioperformance para a regeneração óssea. Para melhorar ainda mais sua bioatividade na regeneração de ossos, as biocerâmicas podem ser enriquecidas com outros tipos de substâncias com propriedades osteogênicas, como a curcumina, que além de suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, estimula a diferenciação e mineralização de células ósseas, prevenindo a deterioração da estrutura do osso, com mudanças benéficas na regeneração e crescimento ósseo. Para melhorar sua biodisponibilidade, a curcumina pode ser complexada com a  $\beta$ -ciclodextrina, que promove sua liberação controlada, potencializando seus efeitos biológicos e mantendo suas propriedades farmacológicas.

**OBJETIVOS:** O objetivo desse trabalho foi delinear a importância do aproveitamento dos resíduos de abate de animais na redução do impacto negativo sobre o meio ambiente e na sua transformação em outros produtos comercializáveis, podendo gerar produtos altamente rentáveis para a indústria. Dentre esses produtos, foi abordado o sulfato de condroitina, que pode ser obtido de subprodutos de aves e suínos, fornecendo diversos benefícios para a saúde. Além disso, foi avaliada as propriedades físico-químicas e estruturais do fosfato de cálcio bifásico (BCP) extraído de ossos de Tilápia do Nilo e do seu *scaffold*. Com a intenção de avaliar se a presença da curcumina livre e complexada com  $\beta$ -CD ( $\beta$ -ciclodextrina) associada ao BCP melhora a performance do material, foi avaliada sua bioatividade em testes *in vitro* e, em testes *in vivo* em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, sua capacidade em promover efeito adicional ao BCP na regeneração óssea.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi feito um estudo de revisão sobre o aproveitamento dos resíduos gerados pela agroindústria e seu impacto sobre o meio ambiente, em especial o sulfato de condroitina e seus benefícios, com o objetivo de caracterizá-las e discorrer sobre seus diversos benefícios para a saúde. No outro artigo, resíduos dos ossos de Tilápia do Nilo foram utilizados na produção de biocerâmicas a base de fosfato de cálcio, com ação na regeneração óssea. Após produção dos *scaffolds* de BCP (fosfato de cálcio bifásico), foi realizada a caracterização do pó utilizando as metodologias de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e micro-Raman, além da morfologia avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e tamanho da partícula. A análise por difração de raios X (DRX) e refinamento de Rietveld foram utilizados para quantificar as fases cristalinas presentes no BCP. Os poros dos *scaffolds* foram avaliados por MEV. Posteriormente foi feita a complexação da curcumina com  $\beta$ -CD sendo os *scaffolds* impregnados com curcumina livre e complexada com  $\beta$ -CD. Para os estudos *in vitro* foi realizado o teste *Simulated Body Fluid* (SBF), sendo as alterações, após 28 dias de imersão em SBF, observadas em MEV e detector de energia dispersiva de raios-X (EDS) em três

grupos: fosfato de cálcio bifásico (BCP), com curcumina livre (BCP-CL) e complexada com  $\beta$ -CD (BCP-CD). Foi conduzido estudo da regeneração óssea *in vivo* durante 60 dias, realizando análises histológicas para avaliação das mudanças morfológicas e de micro-Raman, para avaliar a absorção das fases do material nos diferentes grupos e tempos de implantação (15, 30, 45 e 60 dias).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resíduos de origem animal, provenientes de abatedouros de aves e suínos podem gerar uma série de impactos, tanto ambientais como de saúde pública. A reciclagem é a melhor via de destinação, uma vez que esses resíduos podem ser transformados em produtos comerciais de alto valor agregado, como o SC, que é um polímero natural, solúvel em água, constituído de cadeias repetidas de mucopolissacarídeos. Apresenta benefícios em diversas doenças, tanto isolado como combinado com outras substâncias ativas. Evidências mostram esses benefícios na reparação óssea, no tratamento da osteoartrite, em cirurgias de cataratas na oftalmologia, além de sua ação antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer. No ramo da estética, pode ser utilizado na engenharia de tecidos da pele, com efeitos positivos no rejuvenescimento facial, além de seu uso em nanotecnologia, atuando na distribuição controlada de fármacos. Com relação ao segundo artigo, quando avaliado os biomateriais extraídos de ossos de peixe (Tilápia do Nilo), os resultados mostraram que o BCP é composto por 57,2% de HAp (hidroxiapatita) e 42,8% de  $\beta$ -TCP ( $\beta$  fosfato-tricálcico) e a razão molar Ca/P correspondeu a 1,59. Os *scaffolds* apresentaram porosidade aberta de 57,21%, com presença de macro e microporosidade, além de poros interconectados. As análises de FTIR apresentaram os grupos funcionais  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{OH}^-$  presentes na biocerâmica de BCP. O micro-Raman apresentou os picos referentes HAp e  $\beta$ -TCP, sendo a banda em  $962\text{ cm}^{-1}$  característica da fase HAp, enquanto aquelas localizadas em  $952$  e  $972\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à fase  $\beta$ -TCP. Nas análises de SBF, foi observada a ocorrência de nucleação (precipitação) de uma camada apatita na superfície das três amostras analisadas (BCP, BCP-CL e BCP-CD), com características semelhantes e que mostram a bioatividade dos materiais analisados. As análises de micro-Raman, após implante na calvária de rato, mostraram redução ao longo do período de estudo da fase  $\beta$ -TCP. Quando os grupos foram comparados entre si, o grupo BCP apresentou acentuado decaimento da banda  $\beta$ -TCP até o período de 30 dias após o implante, sendo a maior redução nos primeiros 15 dias. Nos grupos BCP-CL e BCP-CD, o decaimento das bandas de absorção do  $\beta$ -TCP foram menos acentuadas ao longo do tempo. Na análise morfológica, houve maior frequência de poros preenchidos com tecido ósseo em graus variados de diferenciação após 60 dias de estudo, porém, com características semelhantes entre os grupos, sendo que BCP-CL e BCP-CD não apresentaram ação adicional da curcumina livre ou complexada com  $\beta$ -CD na regeneração óssea.

**CONCLUSÃO:** Os resíduos agroindustriais tem sido alvo de estudos por diversos anos, sendo realizadas pesquisas com o objetivo de encontrar meios conscientes e responsáveis para a utilização destes materiais. Do ponto de vista ambiental, atenuar o impacto causado pelos resíduos é considerado de alta importância, valorizando, assim, o meio ambiente e reduzindo o acúmulo de resíduos no ecossistema. O SC é um ativo largamente utilizado e rentável para as indústrias, proporciona relevantes benefícios para saúde humana e é resultante do aproveitamento dos resíduos de abate de animais, proporcionando redução do impacto negativo dos mesmos sobre o meio ambiente. Os ossos de peixes, como da tilápia do Nilo, são excelente fonte de obtenção e produção de biocerâmicas naturais. O BCP utilizado apresentou as características físico-químicas e estruturais para um bom biomaterial. Após impregnação do BCP com curcumina livre e complexada com  $\beta$ -CD, os materiais mostraram capacidade em induzir a cristalização de apatita semelhante ao osso *in vitro*, com resultados semelhantes ao BCP controle. As análises *in vivo* mostraram que

a incorporação da curcumina, principalmente da complexada com  $\beta$ -CD, prolongou a liberação da fase  $\beta$ -TCP. Este resultado apresenta-se como uma característica interessante para a engenharia de tecidos ósseos, sendo uma alternativa no desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada da fase  $\beta$ -TCP.

Palavras-chave:  $\beta$ -ciclodextrina; Biomateriais; Cartilagem; Curcumina; Fosfato de cálcio bifásico; Osteoartrite; Engenharia de materiais; Reciclagem, Resíduos agroindustriais, Regeneração óssea; Sulfato de condroitina.

## ARTICLE 1 - MOLECULES

Article

# Bioperformance Studies of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds Extracted from Fish Bones Impregnated with Free Curcumin and Complexed with B-Cyclodextrin in Bone Regeneration

Cecilia V. R. Truite <sup>1,\*</sup>, Jessica N. G. Noronha <sup>2</sup>, Gabriela C. Prado <sup>2</sup>, Leonardo N. Santos <sup>2</sup>, Raquel S. Palácios <sup>3</sup>, Adriane do Nascimento <sup>3</sup>, Eduardo A. Volnistem <sup>3</sup>, Thamara T. da Silva Crozatti <sup>4</sup>, Carolina P. Francisco <sup>5</sup>, Francielle Sato <sup>3</sup>, Wilson R. Weinand <sup>3</sup>, Luzmarina Hernandes <sup>2</sup> and Graciette Matioli <sup>1,\*</sup>

**Citation:** Truite, C.V.R.; Noronha, J.N.G.; Prado, G.C.; Santos, L.N.; Palácios, R.S.; do Nascimento, A.; Volnistem, E.A.; da Silva Crozatti, T.T.; Francisco, C.P.; Sato, F.; et al. Bioperformance Studies of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds Extracted from Fish Bones Impregnated with Free Curcumin and Complexed with B-Cyclodextrin in Bone Regeneration. *Biomolecules* **2022**, *12*, 383. <https://doi.org/10.3390/biom12030383>

Academic Editors: Prakash Kulkarni, Georgia N. Valsami

Received: 29 November 2021

Accepted: 18 January 2022

Published: 28 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Pharmacy, State University of Maringá (UEM), 5790 Colombo Avenue, Maringá 87020-900, PR, Brazil
- <sup>2</sup> Department of Morphological Sciences, State University of Maringá (UEM), 5790 Colombo Avenue, Maringá 87020-900, PR, Brazil; jessicangnoronha@gmail.com (J.N.G.N.); gacprado@gmail.com (G.C.P.); ra106968@uem.br (L.N.S.); luzhernandes@gmail.com (L.H.)
- <sup>3</sup> Department of Physics, State University of Maringá (UEM), 5790 Colombo Avenue, Maringá 87020-900, PR, Brazil; pg53643@uem.br (R.S.P.); adriane.fisica@gmail.com (A.d.N.); e.volnistem@gmail.com (E.A.V.); fransatou@gmail.com (F.S.); wilson@dfi.uem.br (W.R.W.)
- <sup>4</sup> Department of Food Engineering, State University of Maringá (UEM), 5790 Colombo Avenue, Maringá 87020-900, PR, Brazil; thamarathaiane01@hotmail.com
- <sup>5</sup> Department of Chemical Engineering, State University of Maringá (UEM), 5790 Colombo Avenue, Maringá 87020-900, PR, Brazil; carol\_pfrancisco@hotmail.com
- \* Correspondence: ceciliatruite@gmail.com (C.V.R.T.); gmatlioli@uem.br (G.M.); Tel.: +55-44-30113868 (G.M.)

**Abstract:** Fish bones are a natural calcium phosphate (CaP) sources used in biomaterials production for bone regeneration. CaP scaffolds can be enriched with other substances with biological activity to improve bone repair. This study aimed to evaluate the physicochemical properties and bone regeneration potential of biphasic calcium phosphate (BCP) scaffolds impregnated with free curcumin (BCP-CL) or complexed with  $\beta$ -cyclodextrin (BCP-CD) compared to BCP scaffolds. Rietveld's refinement showed that BCP is composed of 57.2% of HAp and 42.8% of  $\beta$ -TCP and the molar ratio of Ca/P corresponds to 1.59. The scaffolds presented porosity (macro and microporosity) of 57.21%. Apatite formation occurred on the BCP, BCP-CL, and BCP-CD surface, *in vitro*, in SBF. Micro-Raman technique showed a reduction in the dissolution rate of  $\beta$ -TCP in the curcumin-impregnated scaffolds over time, and *in vivo* studies on critical-size defects, in rat calvaria, had no additional regenerative effect of BCP-CL and BCP-CD scaffolds, compared to BCP scaffolds. Despite this, the study showed that curcumin impregnation in BCP scaffolds prolongs the release of the  $\beta$ -TCP phase, the BCP- phase with the higher osteoinductive potential, representing an advantage in tissue engineering.

**Keywords:** biphasic calcium phosphate; biomaterials; bone regeneration; curcumin;  $\beta$ -cyclodextrin; materials engineering

## 1. Introduction

Biomaterials are used to restore, repair or replace injured tissues, promoting cell migration and adhesion, tissue growth and nutrient diffusion [1–3]. Their regenerative ability is associated with its physicochemical properties, such as crystallinity, solubility, phase composition, surface chemistry, ionic charge, roughness and porosity [4,5].



The most commonly used biomaterials for bone regeneration are the calcium phosphate-based ones. Hydroxyapatite (HAp) or biphasic calcium phosphate (BCP) are alternatives to autologous bone grafting (gold standard), and are widely used to promote bone regeneration due to their osteoinductive properties [6,7]. BCP, formed by mixing HAp with  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -tricalcium phosphate), has a greater osteoinductive potential than HAp or  $\beta$ -TCP alone, causing mesenchymal cells to differentiate into osteoblasts with different properties, depending on the HAp/TCP ratio [8,9]. Studies show that the use of BCP has a more active biological action than pure HAp, as it presents characteristics closer to the HAp found in bones, leading to faster bone formation compared to HAp and  $\beta$ -TCP separately [10–12]. *In vitro*, BCP acts in a balanced process between resorption and bone formation, releasing calcium and phosphate ions into the microenvironment and precipitating a biological apatite on the ceramic surface, which is used to build the new bone [5,13,14].

Fluorapatite (FAP), wollastonite, diopside and tricalcium phosphate can be applied in bone regeneration [15,16]. Calcium phosphates (CaPs) can be synthesized [17] or obtained from natural sources. The Nile tilapia is considered to be the most widely produced freshwater fish species in the world. However, only 50 to 60% of the total catch is available for commercialization, while carcasses, dead or damaged fish are discarded, generating a large amount of solid waste thrown into the environment, which causes pollution and risks to public health [18]. The residues can be used for the production of calcium phosphate-based bioceramics, with excellent bioperformance for bone regeneration [19–23].

CaPs can be enriched with other types of substances with osteogenic properties, such as Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), platelet-rich plasma (PRP), growth factors (PDGF (Platelet-derived growth factor) and TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor- $\beta$ 1)) [24,25] and other bioactive substances [26]. Studies show that some herbal medicines, such as curcumin, alone or associated with calcium phosphate ceramics can act as a bone regeneration stimulating agent, with beneficial effects in bone disorders and inflammatory diseases, including osteolysis, periodontitis, rheumatoid arthritis and osteoporosis [27,28].

Curcumin, found in the rhizomes of *Curcuma longa*, is a hydrophobic yellow-orange polyphenol that has been used for centuries as a spice and in pharmaceutical preparations [29]. It shows anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial functions. Besides this, it is being a potent inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and its ligand RANKL, thus stimulating the differentiation and mineralization of primary bone marrow cells and pre-osteoblast. Therefore, it is interesting to study the curcumin role in bone regeneration [30]. Son *et al.*, [31] demonstrated that the use of curcumin, similarly to BMP-2 and growth factors, has the ability to induce osteoblast differentiation and increase the expression of osteocalcin, a marker of bone formation [31], in addition to preventing the deterioration of bone structure, resulting in beneficial changes in bone regeneration and growth [32,33].

However, the use of curcumin is limited by its low water solubility and rapid photodegradation. In order to improve its bioavailability [34], it can be complexed with  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ -CDs).  $\beta$ -CDs are cyclic oligosaccharides, with a hydrophobic cavity that hosts in its interior fat-soluble molecules. Therefore, a controlled release and increased absorption, the pharmacological properties are maintained and the biological effects maximized [35].

In this study, the physicochemical properties of BCP ceramics obtained from bones of the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*), in the form of powder and scaffolds were evaluated. Bone regeneration potential of BCP scaffolds impregnated with free curcumin (BCP-CL) or complexed with  $\beta$ -cyclodextrin (BCP-CD) compared to BCP scaffolds was investigated in *in vitro* studies in SBF (Simulated Body Fluid) and *in vivo* in critical defects in rat calvaria.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Obtaining Biphasic Calcium Phosphate (BCP)

The raw material used in the production of BCP was obtained from bones of the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*), aged between 90 and 100 d, from the Fish Culture Center of the Animal Science Department of the State University of Maringá (Department of Zootechnics - DZO-UEM). The fishes were raised in net tanks at the Rio do Corvo Station on the Diamante do Norte Regional Campus—UEM. The processing of the material was carried out in the Metallic Materials and Biomaterials Laboratory of the Physics Department of the State University of Maringá (Department of Physics—DFI-UEM), via calcination at 900 °C for 8 h followed by grinding in a Retsch PM 100 high energy mill (Haan Germany) at 300 r.p.m. for 8 h, using a grinding jar and zirconia balls, and ball to powder mass ratio of 6/1, according to the procedures contained in PI0506242-0 [36].

### 2.2. Preparation of BCP Scaffolds

The BCP scaffolds were produced by powder metallurgy techniques using lactose as the space holder method [37]. The BCP powder particles (HAp+ $\beta$ TCP) were mixed with the spacer element in a 1:1 ratio (in vol%). The mixture was homogenized gently via mechanical vibration for 30 min and subsequently were uniaxially conformed using a rigid single-acting matrix and a PHP 30 TONs Metal PEM press (Maringá/ Br), in a circular form with 8.1 mm in diameter and 2.5 mm in thickness. The samples were sintered at 1100 °C for 2 h in air atmosphere in a tube furnace. After sintering, the samples were sanded with 400 grit sandpaper until a 1 mm thickness was reached, washed in an ultrasonic bath for 10 min in acetone, alcohol and deionized water to eliminate sintering and sanding residues. The scaffolds were dried in a muffle furnace at 80 °C for 24 h and then kept in the desiccator [38].

### 2.3. Characterization of BCP Powder (HAp+ $\beta$ -TCP)

For the physicochemical characterization of the BCP powder, X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared reflectance (FTIR) and micro-Raman analysis were performed. Some samples of the sintered scaffolds were broken and milled in agate mortar and then in a high-energy mill in air atmosphere for 1 h at 300 r.p.m., using a grinding jar and zirconia balls in a ball to powder mass ratio of 6: 1.

### 2.4. Analysis of Morphology and Particle Size of BCP

For the analysis, the powder particles were subjected to an ultrasonic bath in acetone for 5 min to minimize particle aggregation effects. Particle size distribution analysis (%) was obtained on a Dynamic Light Scattering-DLS equipment (Malvern Instruments Ltd., London, UK) of the COMCAP-UEM (Research Support Center Complex, Maringá, Brazil).

The BCP powder morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) on a FEI Quanta 250 machine (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), manufactured by Oxford Instruments, Oxon, UK. The samples were coated with a conductive gold film by sputtering in a Shimadzu IC-50 Ion Coater metallizer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) of the COMCAP-UEM.

### 2.5. X-ray Diffraction Analysis and Rietveld Refinement

A Shimadzu XRD 7000 X-ray diffractometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) with Cu K $\alpha$  irradiation source ( $\lambda = 0.15418$  nm) was used to determine the phase composition. The data was collected at 40 kV, 30 mA between 10 and 80°, a scan rate of 0.5° / min. and angular increment of 0.02° of the COMCAP-UEM. The phases were identified by comparison with the JCPDS (Joint Committee Series of Powder Diffraction Standards) and ICSD (Database of Inorganic Crystal Structure) standards [39,40]. The Rietveld method was used to quantify the crystalline phases present in BCP using the FullProff program (Version 4.30 - 2008) [41,42].

### 2.6. BCP Powder Analysis by Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectroscopy was used to investigate the compounds and functional groups of the precursor powder, using a Bruker Model Vertex 70v spectrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany). For FTIR analysis, 2 mg of each sample was weighed and diluted in 198 mg of KBr to form the tablets. Each spectrum had an average of 128 scans, ranging from 400 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  of the COMCAP-UEM.

### 2.7. BCP Powder Analysis by Micro-Raman Spectroscopy

Micro-Raman spectroscopy measurements were performed on a Confocal Raman spectrometer, Bruker, Model Senterra (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) at an optical magnification of 20x, using an excitation laser with a wavelength of 532 nm, power of 20 mW and 20 scans, acquired for 3 s in each exposure of the COMCAP-UEM.

### 2.8. Analysis of Scaffolds Porosity

The porosity of the scaffolds was determined by the liquid displacement method of Archimedes Principle, NORM ASTM C373-88 [43], using deionized water, which penetrated the pores without causing any dimensional changes in the sample. The scaffolds were dried for 24 h in an oven at 100 °C. After the samples were cold and dry, the measurements of the sintered dry mass ( $m_s$ ) were made. Next, the samples were placed in a chamber, in which vacuum was established between  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  torr for 2 h to force the liquid into the pores. After this period, the chamber was flooded and there was a 30 min wait at room temperature to measure the impregnated mass ( $m_i$ ) and the impregnated mass under thrust ( $m_e$ ), using a Shimadzu scale (AUW220D, Japan) and Shimadzu Specific Gravity Measurement Kit accessory (DFI-UEM). The porosity values correspond to the average of the values measured in six (06) samples. The open porosity ( $\gamma$  (%)) was calculated by the equation (1) where:  $\gamma$  (%) is open porosity; ( $m_s$ ) the mass of the sintered and dried sample; ( $m_i$ ) the mass of the sample impregnated with the liquid, and ( $m_e$ ) the mass of the sample impregnated under liquid thrust:

$$\gamma(\%) = \left( \frac{m_i - m_s}{m_i - m_e} \right) \times 100 \quad (1)$$

### 2.9. Analysis of BCP Scaffolds by Scanning Electron Microscopy (SEM)

The pores of the scaffolds were observed and evaluated by scanning electron microscopy (SEM) on an FEI Quanta 250 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), manufactured by Oxford Instruments, Oxon, UK. The samples were coated with a conductive gold film by sputtering in a Shimadzu IC-50 Ion Coater metallizer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

### 2.10. Curcumin Complexation with $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) by Coprecipitation Method and Incorporation in BCP Scaffolds

Curcumin and  $\beta$ -CD were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). For the complexation process of curcumin and  $\beta$ -CD, a 0.06M solution of  $\beta$ -CD was placed in a 500 mL flat bottom flask, attached to the condenser, where it was used water at 4 °C for cooling. The magnetic stirrer was set for heating to 70 °C. Curcumin was dissolved in 60 °GL ethanol and added to the flask under dripping. The ethanol was completely removed using a rotary evaporator at 70 °C. Subsequently, the solution was placed in a reactor and stirred for 8h at 25 °C and kept in a refrigerator for 12h at a temperature of 2 to 4 °C. After filtering with white quantitative filter paper (porosity of 4 to 7 $\mu\text{m}$ ), the material was dried in an oven at 50–55 °C for at least 6h. The process was performed in the dark because curcumin degrades easily in light [35].

In order to obtain the free curcumin solution, 1mg/mL of curcumin was added in 70% alcohol. To obtain the solution of curcumin complexed with  $\beta$ -CD, 7.16 mg/mL of the complex was required to ensure that curcumin concentration corresponded to 1mg/mL, equivalent to the 2:1 ratio of cyclodextrin:curcumin.

The scaffolds were soaked in 50 $\mu$ L of the solutions of curcumin in free form and curcumin complexed with  $\beta$ -CD in a dark environment, dried and stored at room temperature, protected from light.

#### 2.11. *In Vitro Bioactivities Study of Scaffolds with Curcumin and Curcumin- $\beta$ -CD*

For the in vitro studies in simulated body fluid (SBF), the sintered scaffolds (control BCP); (BCP soaked in curcumin); (BCP soaked in curcumin-CD) were immersed in 30 mL of an acellular SBF with ionic concentrations: ( $\text{Na}^+$ : 142,0;  $\text{K}^+$ : 5,0;  $\text{Ca}^{2+}$ : 2,5;  $\text{Mg}^{2+}$ : 1,5;  $\text{Cl}^-$ : 147,8;  $\text{HCO}_3^{2-}$ : 4,2;  $\text{HPO}_4^{2-}$ : 1,0;  $\text{SO}_4^{2-}$ : 0,5 mM), close to those of human blood plasma. The reagents KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  were pipetted into a polystyrene flask with ultrapure water at a (controlled) temperature of 36,5 °C and buffered with tris(hydroxymethyl)aminomethane and HCl to a pH of 7,4. The scaffolds were immersed (vertically) in 30 mL of SBF in falcon tubes and placed in a water bath at 36,5 °C for 28 d. After this immersion period, the samples were removed from the SBF, gently washed with ultrapure water and dried at 40 °C. The SBF solution was prepared according to the protocol suggested in the reference [44].

The morphology of the scaffolds after immersion in SBF was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) under the same conditions as mentioned in 2.9.

An analysis of the sample composition was performed using an energy dispersive X-ray detector (EDS), which allows a qualitative and semi-quantitative analysis of the sample composition, enabling, besides the identification of the chemical elements present, the proportion between them [45].

#### 2.12. *In Vivo Bone Regeneration Study Evaluating Scaffolds Impregnated with Curcumin in Free Form and Complexed with B-CD*

All procedures involving the use of animals were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the State University of Maringá, filed under CEUA No. 3379090218.

Sixty adults male Wistar rats weighing between 200 and 250g from the Central Animal House of the State University of Maringá were used. During the experimental period, the animals received chow (Nuvilab<sup>®</sup>/Nuvital<sup>®</sup>, Sogorb<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) and water *ad libitum*.

After intramuscular anesthesia with 2% xylazine hydrochloride (1ml/kg) and 10% ketamine (1ml/kg) 1:1, trichotomy and antisepsis of the head region, an incision was made in the skin, up to the periosteum, from the base of one ear to the other, transversely across the callus. For complete bone exposure, the tissues were detached using a molt spatula.

Using an 8 mm diameter trephine drill (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba, Brazil) on a straight piece (Kavo<sup>®</sup>, Joinville, Brazil), attached to a surgical motor (Branemark System<sup>®</sup>, Zurich, Switzerland) rotating at 1500 rpm and abundant irrigation with sterile saline solution, a bone defect of 0.8 mm deep and 8mm in diameter was made in the calvaria

The scaffolds were implanted in the defects and the flap was sutured with single stitches using Mononylon 4-0 thread (Ethicon<sup>®</sup> Johnson, Bridgewater, NJ, USA). The area received topical application of an alcoholic solution of iodinated polyvinylpyrrolidone as a local antiseptic measure.

The animals were divided into three groups according to the chemical composition of the scaffolds implanted in the bone defect: (1) BCP Group, with pure BCP scaffolds (control); (2) BCP-CL group, with scaffolds impregnated with free curcumin, and (3) BCP-CD with scaffolds impregnated with curcumin impregnated with  $\beta$ -CD.

Euthanasia was performed 15, 30, 45 and 60 d after implantation, with injection of thiopental solution in overdose 120 mg/kg, and samples containing the scaffolds were analyzed.

### 2.12.1. Micro-Raman Spectroscopy Analysis of the Scaffolds Implanted in the Calvaria of the Animals

The scaffold samples implanted in the calvaria of the animals ( $n = 1/\text{time}/\text{group}$ ) were removed, cleaned with ultrapure water, dried for 24 h at room temperature, macerated and homogenized in agate mortar for micro-Raman spectroscopy analyses. Measurements were made in three different points of the samples in the Raman spectrum region between 1000 and 900  $\text{cm}^{-1}$ , according to the equipment and methodology described in item 2.7.

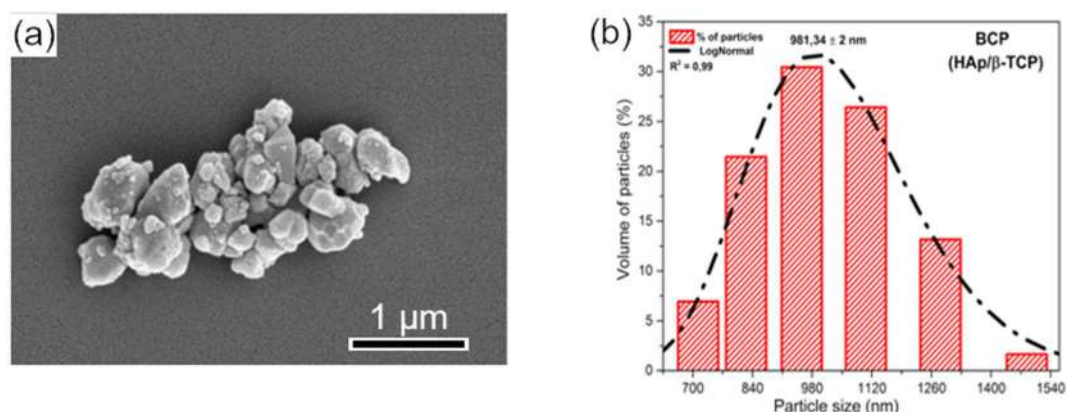
### 2.12.2. Histology of the Scaffolds

For this study, the minimum number of three animals/time/group were used. In 60-d group: BCP,  $n = 3$  animals; BCP-CL and BCP-CD,  $n = 5$  animals. In 45-d group: BCP,  $n = 3$  animals; BCP-CL and BCP-CD,  $n = 4$  animals. In 30 and 15-d groups: BCP, BCP-CL and BCP-CD,  $n = 3$  animals). Calvaria samples were collected, fixated in 4% paraformaldehyde and decalcified in EDTA. Then, the samples were divided in half and processed for paraffin embedding. Serial sections of 7–8  $\mu\text{m}$  were made and stained with H&E to morphological study. For each sample, five slides containing four histological sections each were analyzed by two different observers.

## 3. Results

### 3.1. Analysis of the Morphology and Particle Size of BCP

Scanning electron microscopy (SEM) (Figure 1a) shows the powder morphology of the BCP after calcination at 900 °C. The image reveals weakly aggregated particles of different sizes and smaller than 1100 nm. The histogram presents in Figure 1b shows the particle size distribution between 712.4 and 1483.9 nm, with a center at 981.34 nm and the relation between frequency and particle size. Powder properties influence the microstructure and the physical and mechanical properties of sintered materials, with control of particle size and particle size distribution being important parameters in the processing of materials [46,47].

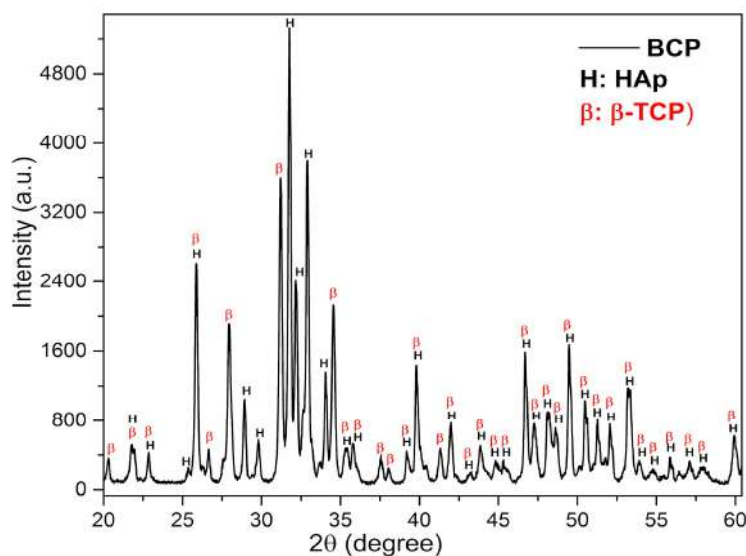


**Figure 1.** Morphology and particle size of BCP powder obtained by calcination fish bones at 900 °C for 8h and milled in air atmosphere in a power mill for 4h at 300 r.p.m.: (a) SEM showing particle shape and size; (b) histogram relating frequency and particle size.  $R^2 = \text{Adjusted R-Square}$ ; BCP = biphasic calcium phosphate; HAp = hydroxyapatite;  $\beta$ -TCP =  $\beta$ -tricalcium phosphate.

### 3.2. X-ray Diffraction Analysis and Rietveld Refinement

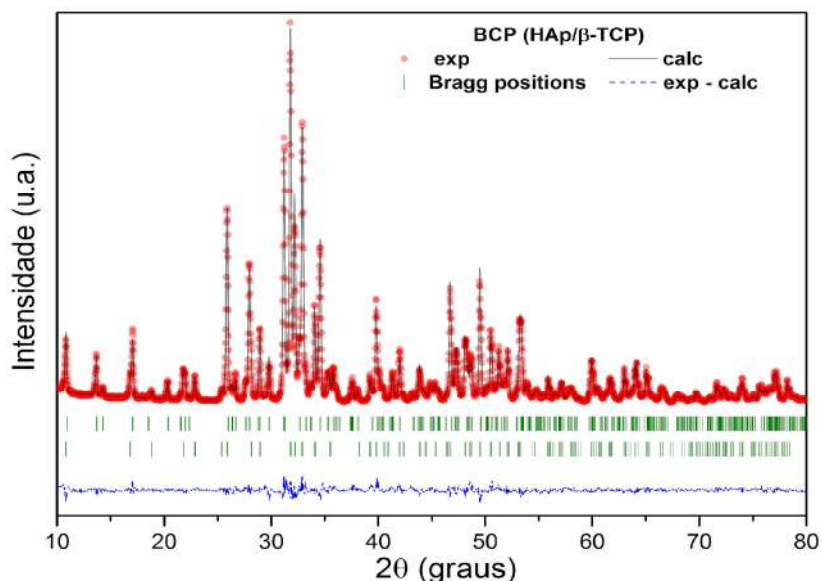
The X-ray diffraction (DRX) pattern of BCP powder after calcination and milling is shown in Figure 2. Characteristic peaks of the HAp (H) and  $\beta$ -TCP ( $\beta$ ) phases are observed

and have been indexed to the Joint Committee on Powder Diffraction Standards, jcpds 09-0432 and 09-0169, respectively [39,40]. No other minority phases were detected within the detection limits of the X-ray technique (~ 2%).



**Figure 2.** DRX pattern of BCP powder obtained by calcining fish bones at 900 °C for 8h and milling in a high-energy mill for 4h at 600 r.p.m. The peaks related to the phases, HAp and  $\beta$ -TCP, are indicated by the letters (H) and (B), respectively. BCP=biphasic calcium phosphate; HAp = Hydroxyapatite;  $\beta$ -TCP =  $\beta$ -tricalcium phosphate.

The structural parameters and mass fraction (wt%) of the crystalline HAp and  $\beta$ -TCP phases identified in the BCP were obtained by structural refinement using the Rietveld method and the computer program Fullprof [41]. For refinement, the diffraction profiles of HAp and  $\beta$ -TCP phases were indexed to Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) standards:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  system hexagonal (space group P63/m) and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  rhombohedral (space group R3c), respectively [41]. A good agreement is observed between the calculated (black solid line) and the experimental (red circles) profile, as can be seen in Figure 3. The bottom line (dashed) corresponds to the difference between the experimental values and those calculated by the theoretical model, while the vertical lines (green) show the Bragg positions calculated by the refinement. In addition, the GoF (Goodness of Fit), which is an indicator of the quality of fit, showed values of 1.4 and 1.8% for HAp and  $\beta$ -TCP phases, respectively. These values are lower than what is considered acceptable by the basic rule for this indicator, that is,  $\text{GoF} = (\text{Rwp}/\text{Rexp}) < 4\%$  [42]. The lattice parameters, the wt% of HAp and  $\beta$ -TCP phases, and the quality factors of the fit are presented in Table 1. The wt% calculated by the Rietveld method shows that the bioceramic BCP is composed of 57.2% HAp and 42.8%  $\beta$ -TCP. The Ca/P molar ratio of the BCP powder, determined by Rietveld refinement, was 1.59.



**Figure 3.** Rietveld refinement results for the calcined and milled BCP powder. The red circles are the experimental XRD data and the black solid line is the refinement result (calculated value). The calculated Bragg positions correspond to the short vertical lines (green), while the bottom trace represents the graph of the difference between the experimental and calculated profile. BCP=biphasic calcium phosphate; HAp = hydroxyapatite;  $\beta$ -TCP= $\beta$ -tricalcium phosphate.

**Table 1.** Fractional mass (wt%), quality factors and structural parameters obtained by the Rietveld refinement.

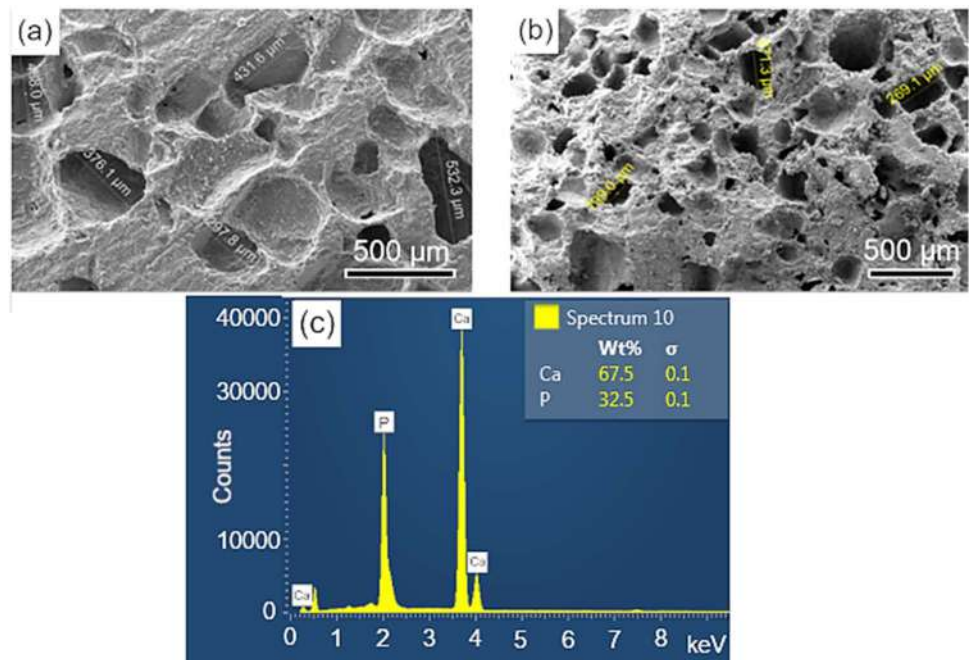
Phase: $\beta$ -TCP - ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )					Phase: HAp - ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )				
System: Rhombohedral - R3c (167)					System: Hexagonal - P63/m (176)				
a = b (Å)	c (Å)	V (Å <sup>3</sup> )	$\rho$ g/cm <sup>3</sup>	wt%	a = b (Å)	c (Å)	V (Å <sup>3</sup> )	$\rho$ g/cm <sup>3</sup>	wt%
10.3480(6)	37.071(2)	3457.9(4)	3,09	42.8	9.422(4)	6.881 (3)	529.30(4)	3.142	57.2
10.4290*	37,380*	3520.91*	3,0*	100*	9.418**	6.884**	528.0**	3.16**	100**

\*jcpds 09-0169 \*\*jcpds 09-0432

### 3.3. Analysis of Scaffolds Porosity by SEM and EDS

The surface and fracture micrographs (SEM) of the scaffolds are shown in Figure 4(a) and 4(b), respectively. There are two types of pores in scaffolds: interconnected macropores, resulting from the elimination of spherical agglomerates of lactose, which have rounded morphology with diameters between 50 and 400  $\mu\text{m}$ ; and micropores in the pore walls, due to the BCP sintering stage. According to Hench et al. [48], for a biomaterial to be considered microporous, it should present interconnected pores with diameters between 50 and 250  $\mu\text{m}$  because they favor cell and tissue penetration, as well as the development of a capillary network, essential for bone neoformation [48,49]. The open porosity of the scaffolds determined by the fluid displacement method (Archimedes Principle) was in the range of 57.21%. Figure 4(c) shows the results of the semi-quantitative chemical analysis by EDS performed on the scaffold surface (Figure 4a). The wt% of Ca (67.5) and P (32.5) resulted in a molar ratio of (Ca/P) of about 1.60, which is close to the value determined from the wt% of the HAp and  $\beta$ -TCP phases obtained via Rietveld refinement of 1.59.



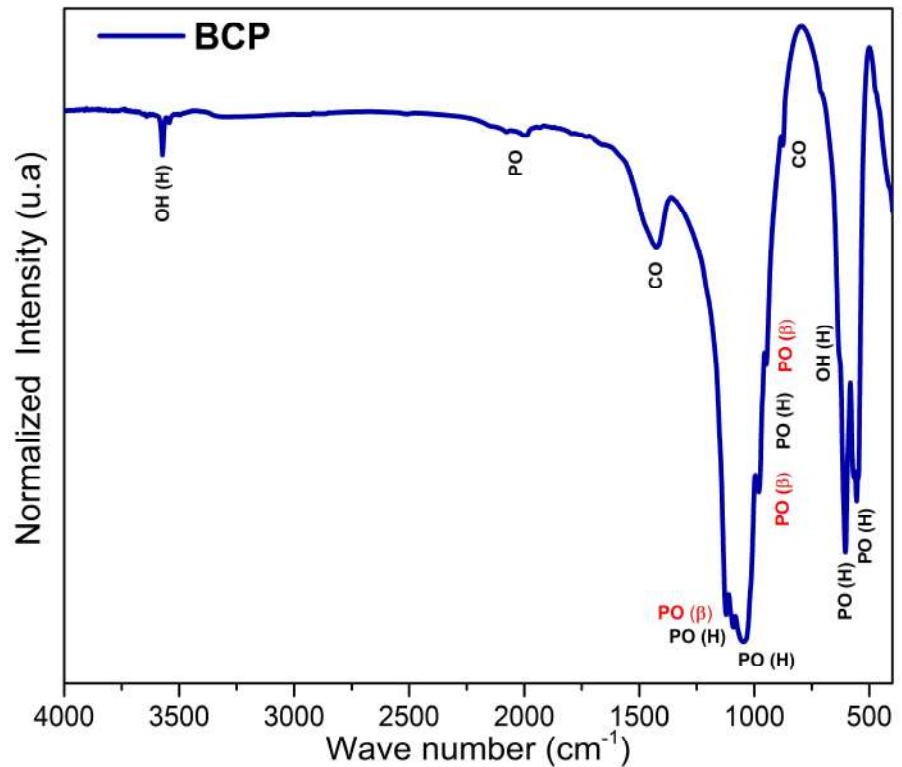


**Figure 4.** SEM of the scaffolds BCP sintered at 1100°C for 8h: (a) surface (sanded with 400 grit sandpaper); (b) fracture; (c) semi-quantitative elemental analysis by EDS performed on the scaffold surface resulted in a molar ratio (Ca/P) of 1.6. Ca = calcium; P = phosphorus; %wt = mass fraction;  $\sigma$  = mean deviation.

#### 3.4. BCP Powder Analysis by Infrared Spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectrum of BCP is shown in Figure 5 with observed vibrations associated with the functional groups  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{OH}^-$ . Bands associated with the non-degenerate symmetric stretching mode ( $\nu_1$ ) of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group, which are related to  $\beta$ -TCP, are detected at 974 and 947  $\text{cm}^{-1}$ , while the one at 962  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to HAp. The bands associated with the asymmetric triple degenerate stretching mode ( $\nu_3$ ) of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group and associated with the HAp phase are located at 1091, 1024  $\text{cm}^{-1}$ , while the one at 1120  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to the  $\beta$ -TCP phase. The triple degenerate strain mode ( $\nu_4$ ) bands of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group, located at 631, 603 and 567  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to HAp, while the one at 551  $\text{cm}^{-1}$  is associated with the  $\beta$ -TCP phase. The band at 470  $\text{cm}^{-1}$  (weak) of the doubly degenerate strain mode ( $\nu_2$ ) of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group is assigned to the HAp phase. The bands at 632 (weak) and 3572  $\text{cm}^{-1}$ , which are typical of HAp, are assigned to the libration ( $\nu_L$ ) and stretching ( $\nu_S$ ) modes of the  $\text{OH}^-$  group, respectively [50,51]. Bands of the antisymmetric stretching ( $\nu_3$ ) and deformation ( $\nu_2$ ) modes of the  $\text{CO}_3^{2-}$  group are detected in the range between 1400 and 1600  $\text{cm}^{-1}$  and at 875  $\text{cm}^{-1}$ , respectively [52].

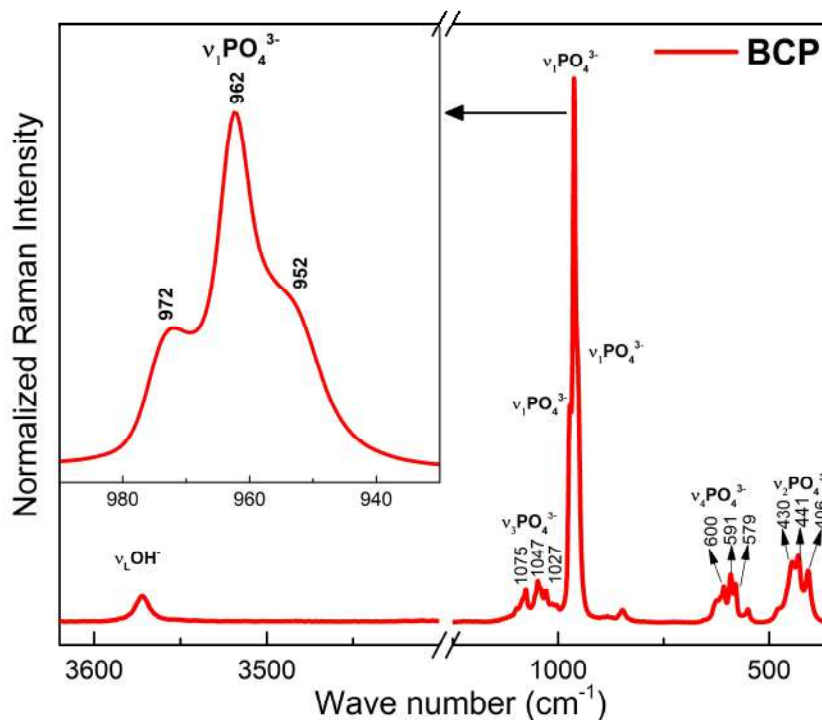




**Figure 5.** FTIR spectra of BCP powder obtained by calcination and milling of the fish bones. PO ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), OH (OH), CO ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), H (Hap) and  $\beta$  ( $\beta$ -TCP). BCP = biphasic calcium phosphate.

### 3.5. BCP Powder Analysis by Micro-Raman

The Raman spectrum of BCP is shown in Figure 6. Characteristic bands of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group are observed and related to the vibrational modes  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$ , of the HAp and  $\beta$ -TCP phases, with a strong overlap of the bands related to these two phases occurring in the  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$  modes. The bands at 430, 441 and 406  $\text{cm}^{-1}$  correspond to the doubly degenerate strain mode ( $\nu_2$ ) of the (O-P-O) bond, while those located at 579, 591 and 600  $\text{cm}^{-1}$  correspond to the triple degenerate strain mode ( $\nu_4$ ) of the (O-P-O) bond. The bands at 1027, 1047 and 1075  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to the antisymmetric triple degenerate stretching mode ( $\nu_3$ ) of the (P-O) bond. The most intense bands in the spectrum, (highlighted), are assigned to the non-degenerate symmetric stretching mode ( $\nu_1$ ) of the (P-O) bond. The band at 962  $\text{cm}^{-1}$  is typical of the HAp phase, while those located at 952 and 972  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to the  $\beta$ -TCP phase. The band at 3572  $\text{cm}^{-1}$ , corresponds to the normal stretching mode ( $\nu_5$ ), of the OH group and associated with the HAp phase [53,54].



**Figure 6.** Raman spectra of the BCP powder obtained by calcination and milling of the fish bones. BCP= biphasic calcium phosphate.

### 3.6. Complexation of Curcumin with $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD)

The curcumin- $\beta$ -CD complex by the co-precipitation method showed an efficiency value of 70% of the amount of curcumin that was initially added to the process. According to Mangolim et al. [35], the efficiency value of complexation by co-precipitation was 74% and, in addition, this process increased the solubility of the dye in water by 31 times, improved its stability to light by 18%, and was also 2.7 times more stable to pH variations.

### 3.7. In Vitro Study of the Bioactivities of Scaffolds

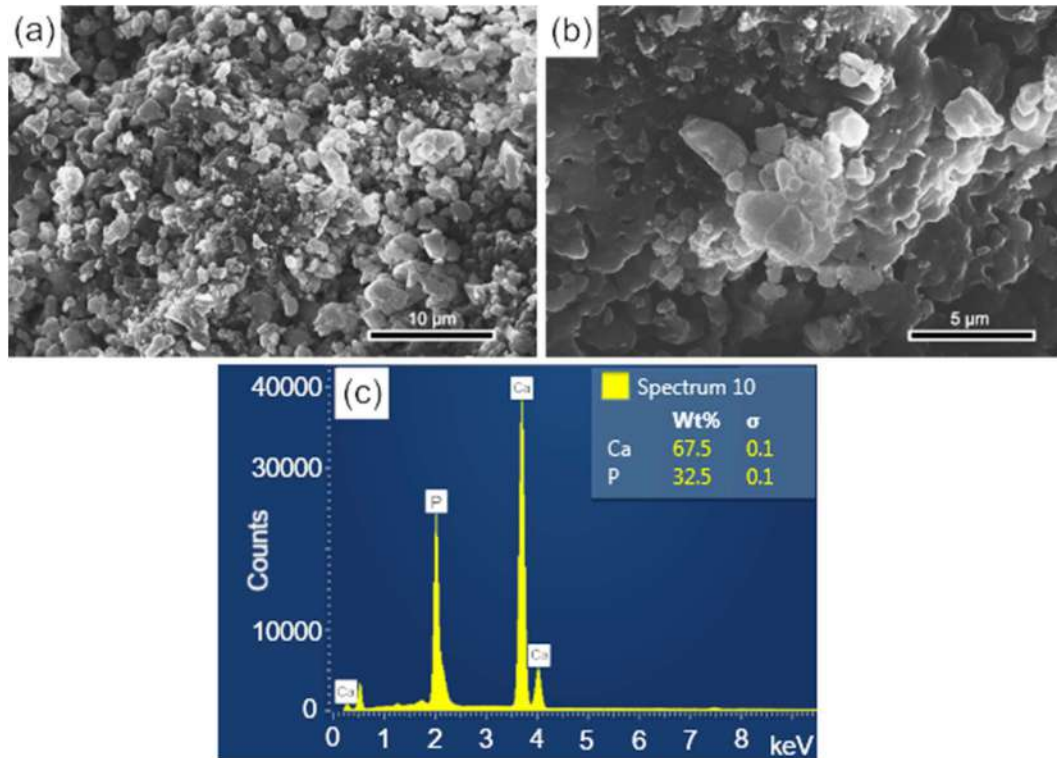
The surfaces of the scaffolds before and after immersion for 28 d in SBF were analyzed by SEM-EDS. In Figure 7(a) and 7(b), at different magnifications, the surface morphology of the sintered scaffold is observed, whose microstructure corresponds to an intermediate stage of sintering with the neck formation and reduction of microporosity [36]. The EDS elemental analysis performed on the sample surface is shown in Figure 7(c). The mass fraction (wt%) of calcium and phosphorus were used to calculate the Ca/P molar ratio of the BCP, which corresponded to a value of 1.60, a number close to that obtained by Rietveld refinement (1.59).

The surfaces of the scaffolds after immersion in SBF were analyzed by SEM-EDS, to evaluate the apatite formation (CaPs) on the surface of these samples. The results are presented in the sequence: BCP (Figure 8); BCP-CL (Figure 9) and BCP-CD (Figure 10). After 28 d of immersion, without fluid renewal, the formation of an apatite layer was observed on the surface of all the samples analyzed, whose morphology can be seen in the corresponding micrographs. At higher magnifications, a morphology composed of apatite nuclei consisting of short micro-stems was observed, as well as clusters of these nuclei, which are characteristic of apatite nucleation and growth in SBFs solution [44].

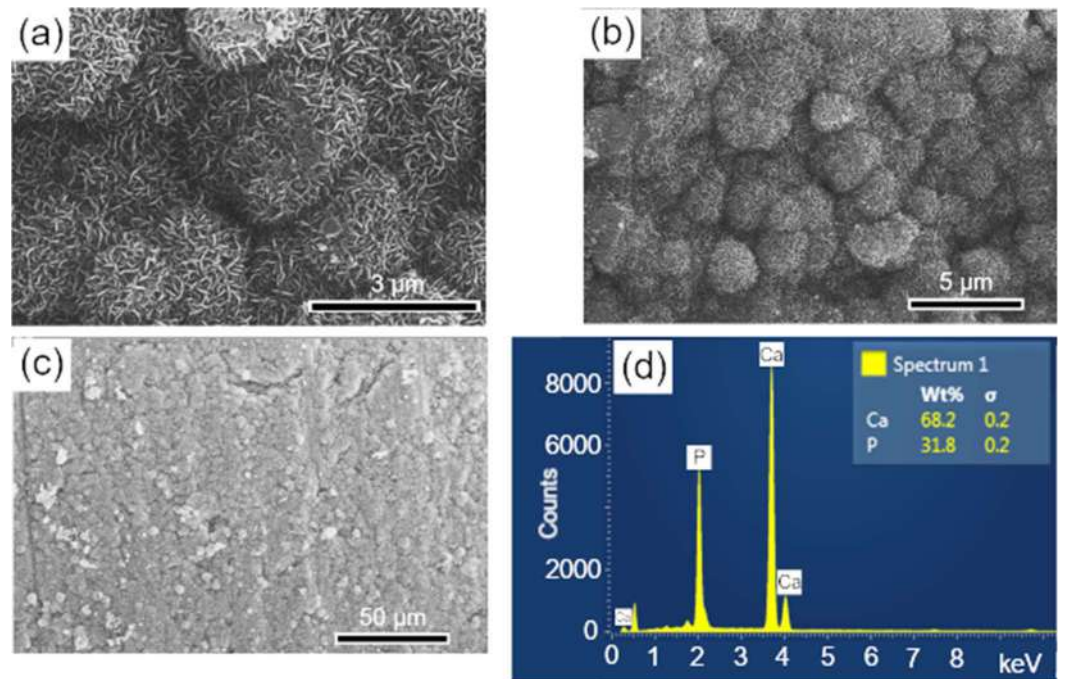
The EDS analysis showed that the molar ratio (Ca/P) of the material precipitated on the surface of the samples corresponded to values of 1.657, 1.657 and 1.662, respectively, which are very close to the HAp molar ratio (1.667) and higher than that observed in the BCP sample before immersion of 1.60. These results may indicate the dissolution of the  $\beta$ -TCP phase during the immersion process in SBF for 28 d, that is, its decomposition to form

the apatite layer on the sample surface [37]. According to Zhang et al. [55], surface bioactivity is related to calcium phosphate precipitation and mineralization, which are affected by the physical and chemical properties of the surface. The processes of nucleation and growth of apatite on the sample occur with the dissolution of its surface and precipitation of the apatite layer [55].

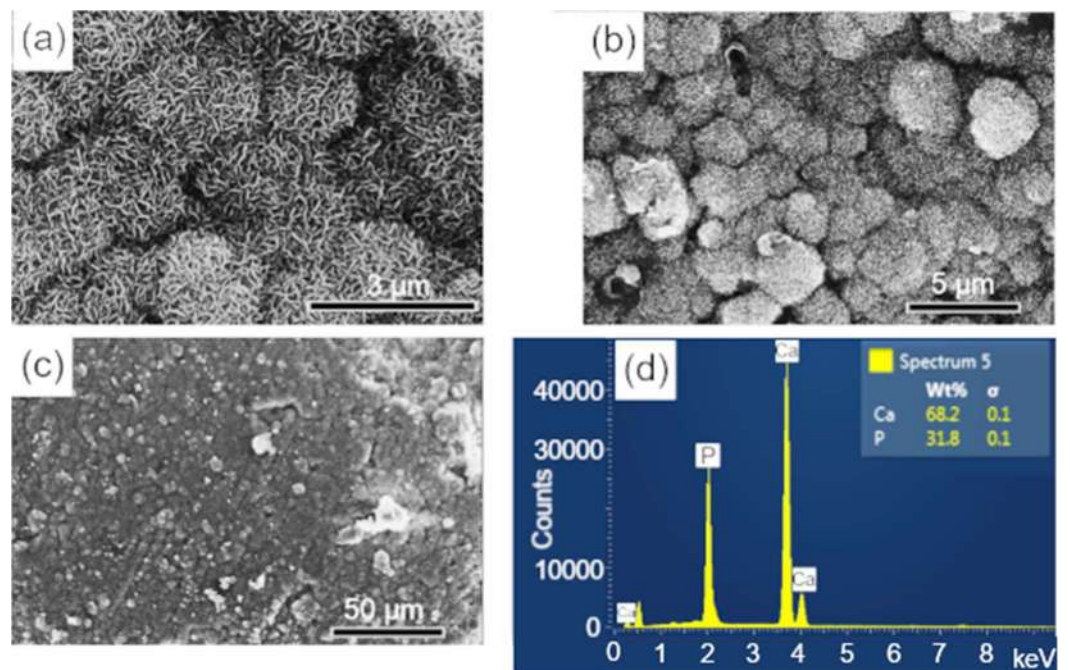
In summary, we observed that after 28 d of immersion in SBF, there was nucleation (precipitation) of an apatite layer on the surface of the three samples analyzed, with similar characteristics and showing the bioactivity of the materials analyzed.



**Figure 7.** SEM images of the scaffold surface (control-BCP) sintered at 1100 °C for 2h, before immersion in SBF: (a) and (b) morphology and microstructure of the surface and (c) EDS obtained on the sample surface. Ca = calcium; P = phosphorus; %wt = mass fraction;  $\sigma$  = mean deviation.

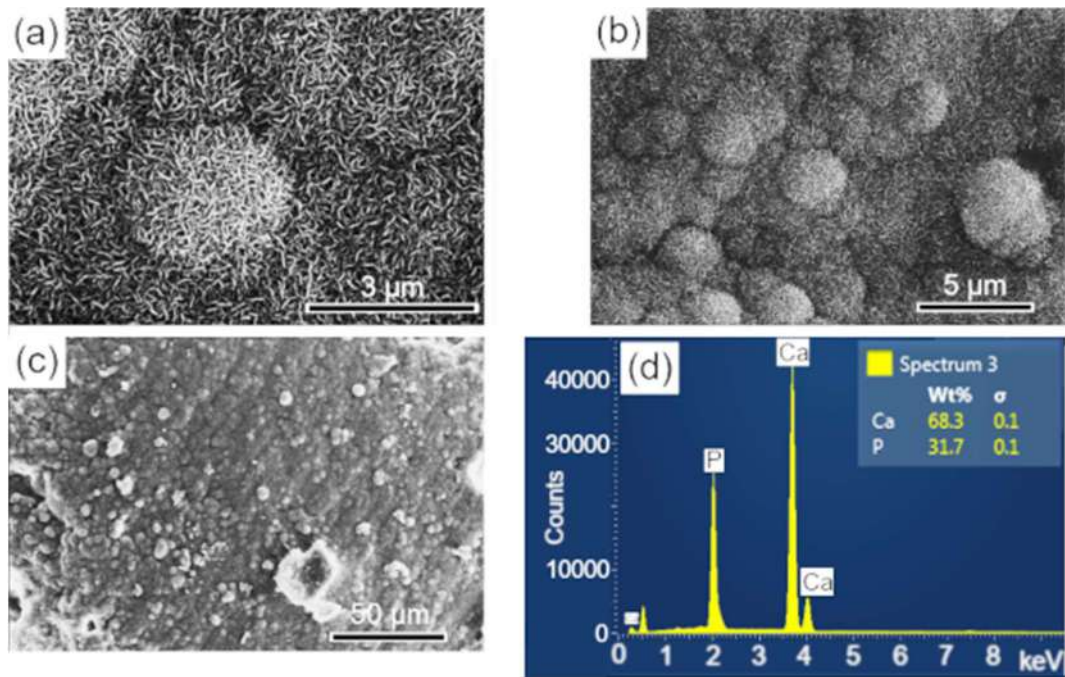


**Figure 8.** SEM micrographs of the scaffold surface (control-BCP) after 28 d of immersion in SBF, showing a characteristic morphology of apatite nucleation in bioactive materials: (a), (b) and (c) images with different magnifications and (d) EDS obtained on the sample surface. Ca = calcium; P = phosphorus; %wt = mass fraction;  $\sigma$  = mean deviation.



**Figure 9.** SEM images of the scaffold surface (BCP-CL) after 28 d of immersion in SBF, showing a characteristic morphology of apatite nucleation in bioactive materials: (a), (b) and (c) images with different magnifications and (d) EDS obtained on the sample surface. Ca = calcium; P = phosphorus; %wt = mass fraction;  $\sigma$  = mean deviation.



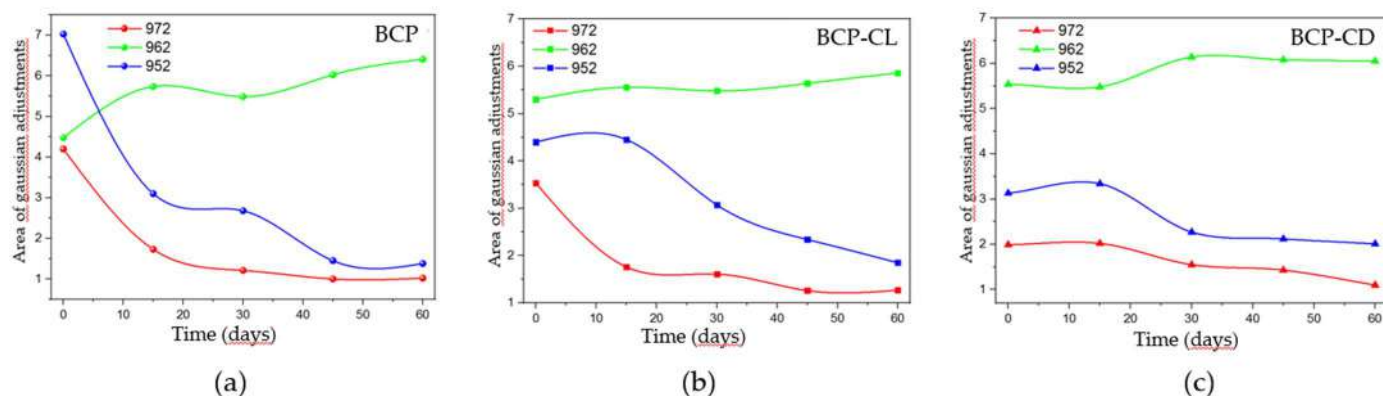


**Figure 10.** SEM images of the scaffold surface (BCP-CD) after 28 d of immersion in SBF, showing a characteristic morphology of apatite nucleation in bioactive materials: (a), (b) and (c) images with different magnifications and (d) EDS obtained on the sample surface. Ca = calcium; P = phosphorus; %wt = mass fraction;  $\sigma$  = mean deviation.

### 3.8. *Ex Vivo* Micro-Raman Analysis of Implants

In order to investigate the optical absorption of the  $\beta$ -TCP phase as a function of the implantation time, the micro-Raman analysis was directed to the spectrum region between 1000 to 900  $\text{cm}^{-1}$  because the  $\beta$ -TCP and HAp phases are most evident in this spectral range. The absorption spectrum of  $\beta$ -TCP can be seen in Figure 6.

The behavior for the bands referring to the  $\beta$ -TCP phase (Figure 11) was obtained after performing Gaussian fits for the BCP, BCP-CL and BCP-CD groups. The bands at 972 and 952  $\text{cm}^{-1}$  decreased over time. When the groups are compared with each other, the BCP group (Figure 11a) has a pronounced decrease until 30 d after implantation, with the greatest reduction in the first 15 d. Figures 11 (b) and (c) show that in the BCP-CL and BCP-CD groups, the decay of the  $\beta$ -TCP bands were less pronounced over time. Comparing the bands of the scaffolds impregnated with free and complexed curcumin with  $\beta$ -CD. It can be seen that the decay of  $\beta$ -TCP in those with free curcumin was slightly more pronounced after 30 d than complexed curcumin with  $\beta$ -CD, suggesting that the controlled release of curcumin interfered with the decay of the bands of  $\beta$ -TCP.



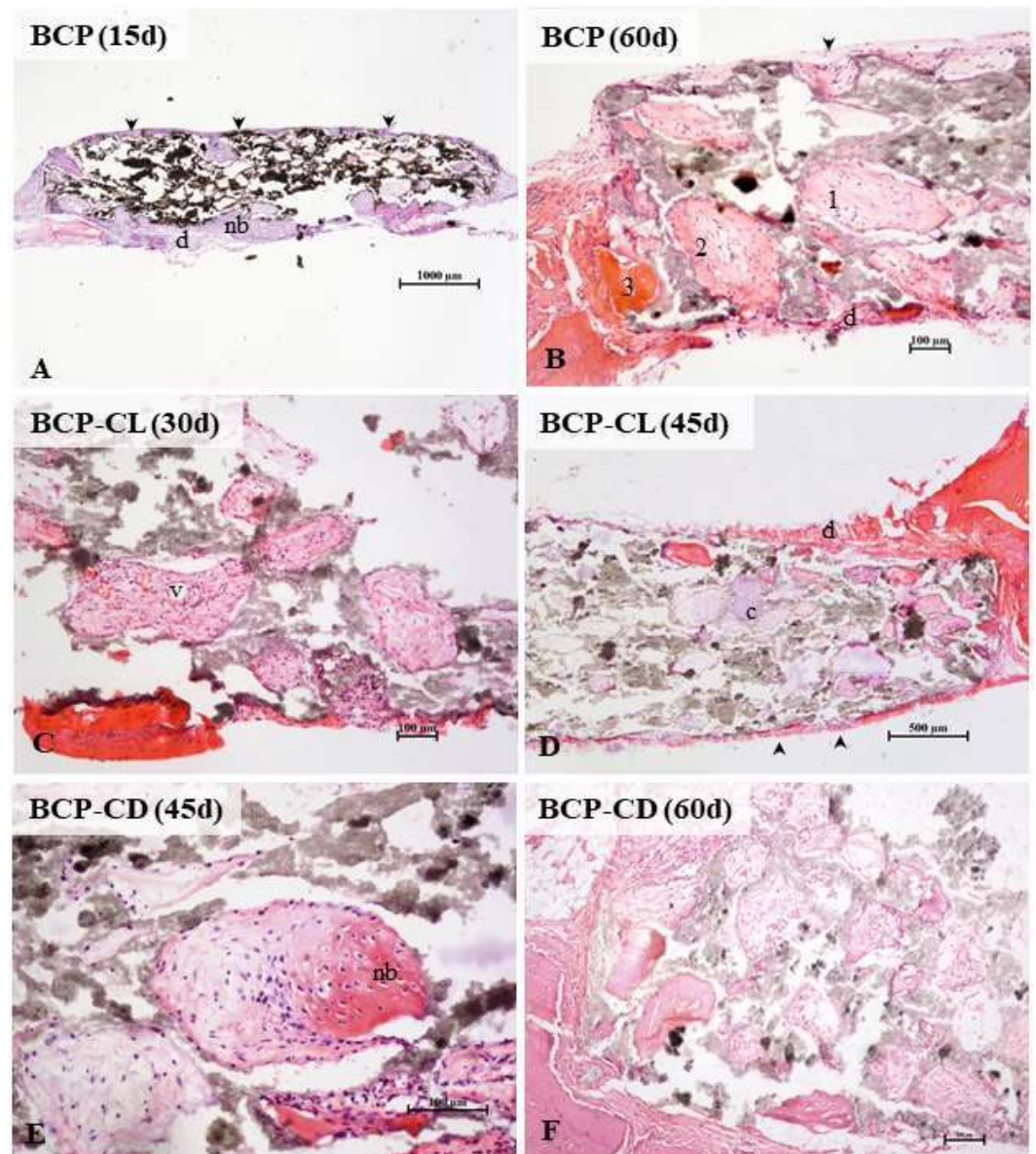
**Figure 11.** Behavior of the areas of the adjusted bands in the Micro-Raman analysis as a function of the analyzed periods, being the band  $962\text{ cm}^{-1}$  referring to HAp and the bands  $972\text{ cm}^{-1}$  and  $952\text{ cm}^{-1}$  referring to  $\beta$ -TCP. (a) BCP, shows the most evident decay in the first 15 d of study of the bands related to  $\beta$ -TCP; (b) BCP-CL and (c) BCP-CD show that the bands related to  $\beta$ -TCP did not present evident decay in the first 15 d, but slow throughout the 60 d of study.

As observed in the behavior of the bands as a function of the analyzed implantation times, it can be suggested that, in the scaffolds impregnated with free or complexed curcumin, there may have been a decrease in the dissolution of the  $\beta$ -TCP phase. The local increase in the ionic concentration produced by the ceramic solubility has a positive impact on the proliferation and differentiation of osteoblasts, as well as on the bone formation process [31,56]. However, both curcumin and  $\beta$ -CD can bind to these ions, interfering with bone formation. Bose et al. [56] suggested that curcumin has chelating ability, and can bind to the calcium ions of HAp-based scaffolds, reducing their solubility and affecting osteogenesis, which is induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  ions present in body fluids. Liang et al. [57] demonstrated that the surfaces of  $\beta$ -TCP crystals are positively charged, generally due to the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions near the surfaces [57]. On the other hand, the outer surface of the  $\beta$ -CD molecules is hydrophilic, so that the OH- groups in this region can bind to the  $\text{Ca}^{2+}$  ions of the calcium phosphate ceramics, reducing the ionic bioavailability, and its effect on the bone regeneration [58,59]. Based on these authors, the results of this study suggest that  $\beta$ -TCP had a slower ionic release as a result of interactions with other molecules in the system.

### 3.9. Histological Study of the Implants

Osteogenesis occurred in the scaffolds of the three groups studied. There was no difference in morphology or amount of bone tissue in the scaffolds, comparing the three groups. First, the pores have been colonized by vascularized connective tissue from the surrounding periosteum and dura mater. Osteogenesis occurred predominantly by intramembranous ossification, typical of the calvaria, but the presence of hyaline cartilage in some pores showed also endochondral ossification.

In the three groups analyzed, the microscopic analysis (Figure 12) showed, over time, a greater frequency of pores filled with bone tissue. At 60 d of study, all pores had some content, being mostly connective tissue in different degrees of maturation, and only a small amount of pores, especially the marginal ones, were totally or partially occupied by mature bone tissue. There was no complete regeneration of any defect in 60 d. Studies have shown that the implantation of porous or non-porous biocomposites in critical-size defects in the calvaria of rats stimulated bone formation, but without promoting complete regeneration even after 90 d of observation [20,21,60,61].



**Figure 12.** Photomicrographs of critical size defects in rat calvaria after implants with scaffolds of BCP (A and B), BCP-CL (C and D) and BCP-CD (E and F). The animals remained with the implants for 15 (A), 30 (C), 45 (D and E) or 60 (B and F) d. The scaffold pores of the three groups studied were filled by cells and blood vessels (v) from the periosteum (arrowhead) and dura mater (d). Intramembranous ossification, typical of the calvaria, was the main type. Initially, a loose connective tissue filled the pores. A primary bone, with denser fibers, irregularly disposed, was deposited from the margins of the pores, followed by lamellar deposition of bone matrix. In the three groups studied, the presence of pores filled with hyaline cartilage was occasionally observed (c). In (A), a panoramic view of a BCP scaffold shows most of the still empty pores and filled peripheral pores. On the dural surface, the (\*) indicates bone formation (nb) in the dura mater. In (B) observe the detail of collagen deposition in the pores. The numbers 1, 2, and 3 (B and C) indicate the gradation in the ossification process. The pore (1) shows the beginning of densification of the loose connective tissue, in (2) larger collagen fiber deposition in the periphery of the pore (primary bone tissue), and in (3), the pore filled with mature lamellar bone. At 45 (D and E) and 60 (B and F) d, more central pores presented colonized by connective tissue, but with little lamellar bone formation. In (E), the detail of a pore in the process of ossification. BCP = biphasic calcium phosphate; CL = free curcumin; CD = curcumin complexed with cyclodextrin; d = dura mater; nb = new bone; arrow head = periosteum; v = blood vessel; c = cartilage. Staining: hematoxylin and eosin.



According to the literature, curcumin is not an inert molecule for bone tissue. In *in vivo* studies, it has been demonstrated potential biological activity on bone tissue.

When administered intraperitoneally, curcumin stimulated bone formation in the rat model of femoral fractures [62]. After oral use, it had positive effects on osteoporosis, attenuating bone lesions [38] and osteopenia, with improvement in bone mineral density [32]. The implantation of curcumin-impregnated scaffolds in a rat distal femur fracture model stimulates bone matrix mineralization, in addition to improving osteogenic and angiogenic capacity in bone regeneration [56].

Although the role of curcumin in bone metabolism is controversial, studies have shown that the use of curcumin, similar to BMP-2 and growth factors, can induce osteoblastic differentiation [31,63,64] and increase the expression of osteocalcin, a marker of bone formation, and has a regulatory role in bone resorption [31,38]. In contrast, Notoya et al. [65] demonstrated that curcumin inhibits the proliferation of osteoblastic cells from the calvaria of rats, inducing the death of human cancerous osteoblasts.

In this study, we expected a better bio performance of the scaffolds with curcumin, considering the already known osteogenic potential of BCP, especially by the  $\beta$ -TCP phase, in addition to the described biological activity of curcumin on bone tissue. We believed that the slow release of curcumin complexed with  $\beta$ -CD could potentiate, in a controlled manner, the osteogenic stimulus in the scaffolds. The micro-Raman results showed that  $\beta$ -TCP dissolution was slower in curcumin-impregnated scaffolds, however, this was not reflected in *in vivo* osteogenesis. Based on the literature [56,57], we can infer that after its dissolution, the ions of the  $\beta$ -TCP molecule were captured by curcumin itself, compromising its availability for bone formation.

#### 4. Conclusions

Bones from the Nile tilapia are an excellent source for obtaining and producing natural bioceramics. In this study, the BCP used presented the physical-chemical and structural characteristics for a good biomaterial. The presence of free curcumin and complexed with  $\beta$ -CD in BCP demonstrated the ability to induce bone-like apatite crystallization *in vitro*, with results similar to BCP control. *In vivo*, qualitative analysis showed that the incorporation of curcumin did not provide additional effect to the studied bioceramics. However, the decrease in the release of  $\beta$ -TCP phase with the presence of curcumin, and especially the one complexed with  $\beta$ -CD, may be an interesting feature for bone tissue engineering, and could also be an alternative for the development of a prolonged release system of  $\beta$ -TCP phase.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.V.R.T., W.R.W., L.H. and G.M.; Formal analysis, C.V.R.T., R.S.P., A.d.N., E.A.V., F.S., W.R.W., L.H. and G.M.; Funding acquisition, G.M.; Investigation, C.V.R.T., J.N.G.N., L.N.S., R.S.P., A.d.N., E.A.V., F.S., W.R.W., L.H. and G.M.; Methodology, C.V.R.T., J.N.G.N., G.C.P., R.S.P., A.d.N., T.T.d.S.C., C.P.F., F.S., W.R.W., L.H. and G.M.; Project administration, G.M.; Supervision: G.M., Writing—original draft, C.V.R.T., W.R.W., L.H. and G.M.; Writing—review and editing, W.R.W., L.H. and G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CNPq, Fundação Araucária and CAPES.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of STATE UNIVERSITY OF MARINGA - Brazil (protocol code 3379090218 and approved in March 2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data available upon request.

**Acknowledgments:** The authors are thankful to the Brazilian Agencies CAPES, CNPq and Fundação Araucária for their financial support of this work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.

## References

- Mohd Pu'ad, N.A.S.; Koshy, P.; Abdullah, H.Z.; Idris, M.I.; Lee, T.T.D.S.C. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon* **2019**, *5*, e01588. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01588>.
- Szcześ, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci* **2017**, *249*, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>.
- Rose, F.R.; Hou, Q.; Oreffo, R.O. Delivery systems for bone growth factors: The new players in skeletal regeneration. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 415–427. <https://doi.org/10.1211/0022357023312>.
- Samavedi, S.; Whittington, A.R.; Goldstein, A.S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 8037–8045. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>.
- Eliaz, N.; Metoki, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical. *Materials (Basel)* **2017**, *10*, 334 <https://doi.org/10.3390/ma10040334>.
- Kumar, P.; Vinitha, B.; Fathima, G. Bone grafts in dentistry. *J. Pharm Bioallied Sci* **2013**, *5*(Suppl 1), S125–S127. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113312>.
- Dorozhkin, S.V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *J. Mat. Sci.* **2009**, *44*, 2343–2387. <https://doi.org/10.1007/s10853-008-3124-x>.
- Tang, Z.; Li, X.; Tan, Y.; Fan, H.; Zhang, X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regen Biomater* **2018**, *5*, 43–59. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx024>.
- Pae, H.C.; Kang, J.H.; Cha, J.K.; Lee, J.S.; Paik, J.W.; Jung, U.W.; Choi, S.H. Bone regeneration using three-dimensional hexahedron channel structured BCP block in rabbit calvarial defects. *J. Biomed. Mater. Res. B* **2019**, *107*, 2254–2262. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34317>.
- Muhammad, A.; Rashid, A.; Imran, S.; Wan, A.; Ibrahim, I.W.; Rafaqat, H. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *J. Mater. Sci* **2014**, *49*, 1461–1475. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7864-x>.
- Liu, B.; Lun, D.X. Current Application of  $\beta$ -tricalcium Phosphate Composites In orthopaedics. *Orthop Surg* **2012**, *4*, 139–144. <https://doi.org/10.1111/j.1757-7861.2012.00189.x>.
- Yubao, L.; Xingdong, Z.; Groot, K. Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials* **1997**, *18*, 737. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00203-7).
- Szpalski, C.; Barr, J.; Wetterau, M.; Saadeh, P.B.; Warren, S.M. Cranial bone defects: Current and future strategies. *Neurosurg Focus* **2010**, *29*, E8. <https://doi.org/10.3171/2010.9.FOCUS10201>.
- Sendemir-Urkmez, A.; Jamison, R.D. The addition of biphasic calcium phosphate to porous chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2007**, *81*, 624–633. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31010>.
- Skallevoid, H.E.; Rokaya, D.; Khurshid, Z.; Zafar, M.S. Bioactive Glass Applications in Dentistry. *Int J. Mol. Sci* **2019**, *20*, 5960–5984. <https://doi.org/10.3390/ijms20235960>.
- Kim, J.; Kim, H.J.; Chang, S.W.; Oh, S.; Kim, S.Y.; Choi, K.K.; Kim, D.S.; Jang, J.H. Effect of bioactive glass addition on the physical properties of mineral trioxide aggregate. *Biomater Res.* **2021**, *25*, 39–50. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00238-2>.
- Döbelin, N.; Luginbühl, R.; Böhner, M. Synthetic calcium phosphate ceramics for treatment of bone fractures. *Chimia (Aarau)* **2010**, *64*, 723–729. <https://doi.org/10.2533/chimia.2010.723>.
- Tsagarakis, K.; Palialexis, A.; Vassilopoulou, V. Mediterranean fishery discards: Review of the existing knowledge. *ICES J. Mar. Sci* **2014**, *71*, 1219–1234. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fst074>.
- Prado, G.C.; Weinand, W.R.; Volnistem, E.A.; Baesso, M.L.; Noronha, J.N.; Truite, C.; Souza, B.M.; Bonadio, T.M.; Hernandez, L. Physicochemical and bone regeneration studies using scaffoldings of pure natural hydroxyapatite or associated with Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Mater. Chem Phys.* **2021**, *272*, 124922. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124922>.
- Kiyochi Jr, H.J.; Candido, A.G.; Bonadio, T.G.M.; da Cruz, J.A.; Baesso, M.L.; Weinand, W.R.; Hernandez, L. In vivo evaluation of interactions between biphasic calcium phosphate (BCP)-niobium pentoxide (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) nanocomposite and tissues using a rat critical-size calvarial defect model. *J Mater Sci: Mater Med* **2020**, *31*, 71. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06414-5>.
- Bonadio, T.M.G.; Fiorentina, E.R.; Candido, A.G.; Miyahara, R.Y.; Freitas, V.F.; Kiyochi Jr, H.J.; Hernandez, L.; Rosso, E.R.; Burato, J.A.; Santos, I.A.; Baesso, M.L.; Weinand, W.R. Enhanced mechanical properties and osseointegration features of CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>-PNb<sub>9</sub>O<sub>25</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> triphasic nanostructured bioceramics derived by optimised sinterization of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and natural hydroxyapatite- $\beta$ -tricalcium phosphate. *Ceram. Int* **2020**, *46*, 12837–12845. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.02.054>.
- Corrêa, T.H.A.; Holanda, J.N.F. Fish Bone as a Source of Raw Material for Synthesis of Calcium Phosphat. *Mat. Res.* **2019**, *22* (suppl 1), e20190486. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2019-0486>.
- Granito, R.N.; Renno, A.C.M.; Yamamura, H.; Almeida, M.C.; Ruiz, P.L.M.; Ribeiro, D.A. Hydroxyapatite from Fish for Bone Tissue Engineering: A Promising Approach. *Int J. Mol. Cell Med.* **2018**, *7*, 80–90. <https://doi.org/10.22088/ijmcm.bums.7.2.80>.
- Labusca, L.S.; Cionca, D. Clinical Review about the Role of Platelet Rich Plasma for the Treatment of Traumatic and Degenerative Musculoskeletal Disorders. *Ortho & Rheum Open Access J.* **2016**, *2*, 555589. <https://doi.org/10.19080/OROAJ.2016.02.555589>.

25. Santos, A.A.; Miranda, C.D.O.; Alves, M.T.S., Faloppa, F. The role of bone morphogenetic protein on bone tissue repair. *Acta ortop bras* **2005**, *13*, 194–195. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522005000400009>.
26. Lin, F.H.; Dong, G.C.; Chen, K.S.; Jiang, G.J.; Huang, C.W.; Sun, J.S. Immobilization of Chinese herbal medicine onto the surface-modified calcium hydrogenphosphate. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2413–2422. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00031-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00031-0).
27. Hie, M.; Yamazaki, M.; Tsukamoto, I. Curcumin suppresses increased bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J. Pharmacol* **2009**, *621*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.025>.
28. Martins, C.A.; Leyhausen, G.; Volk, J.; Geurtsen, W. Curcumin in combination with piperine suppresses osteoclastogenesis in vitro. *J. Endodont* **2005**, *41*, 1638–1645. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.009>.
29. Rohanizadeh, R.; Deng, Y.; Verron, E. Therapeutic actions of curcumin in bone disorders. *Bonekey Rep.* **2016**, *2*, 793. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.20>.
30. Jain, S.; Meka, S.R.K.; Chatterjee, K. Curcumin eluting nanofibers augment osteogenesis toward phytochemical based bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* **2016**, *6*, 055007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/5/055007>.
31. Son, H.E.; Kim, E.J.; Jang, W.G. Curcumin induces osteoblast differentiation through mild-endoplasmic reticulum stress-mediated such as BMP2 on osteoblast cells. *Life Sci* **2018**, *15*, 34–39.
32. Yang, M.W.; Wang, T.H.; Yan, P.P.; Chu, L.W.; Yu, J.; Gao, Z.D.; Li, Y.Z.; Guo, B.L. Curcumin improves bone microarchitecture and enhances mineral density in APP/PS1 transgenic mice. *Phytomed* **2011**, *18*, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.05.011>.
33. French, D.L.; Muir, J.M.; Webber, C.E. The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: An assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomed* **2008**, *15*, 1069–1078. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.007>.
34. Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm* **2007**, *4*, 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>.
35. Mangolim, C.S.; Moriwaki, C.; Nogueira, A.C.; Sato, F.; Baesso, M.L.; Neto, A.M.; Matioli, G. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem* **2014**, *15*, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.067>.
36. Weinand, W.R.; Lima, W.M. Processo de obtenção de hidroxiapatita via calcinação de osso de peixe - PI 0506242-0. *Rede dos Núcleos de Inovação Tecnológica do Paraná* **2017**. Available online: <http://www.nitpar.pr.gov.br/producao-de-hidroxiapatita-via-calcinacao-de-osso-de-peixe/> (accessed 20th March 2018).
37. Vuong, B.X. Synthesis and characterization of HA/ $\beta$ -TCP bioceramic powder. *Vietnam J. Chem* **2018**, *56*, 152–155. <https://doi.org/10.1002/vjch.201800004>.
38. Chen, Z.; Xue, J.; Shen, T.; Um, S.; Fu, Q. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway. *Int J. Mol. Med.* **2016**, *37*, 329–338. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2432>.
39. JCPDS International Centre for Diffraction Data of this page and all contents. All Rights Reserved. Conditions of Use. 12 Campus Blvd., Newtown Square, PA U.S.A. Available online: <https://www.icdd.com> (accessed 30th April 2019).
40. ICSD, Inorganic Crystal Structure Database. Available online: [https://www.fiz-karlsruhe.de/icسد\\_home.html](https://www.fiz-karlsruhe.de/icسد_home.html) (accessed 30 April 2019).
41. Rodriguez-Carvajal, J. FULLPROF. A program for Rietveld, profile matching and integrated intensities refinement of X-ray and/or neutron data. Laboratoire Leon Brillouin: CEA-Saclay, France, 2000. Available online: [http://mill2.chem.ucl.ac.uk/tutorial/fullprof/doc/fp\\_frame.htm](http://mill2.chem.ucl.ac.uk/tutorial/fullprof/doc/fp_frame.htm) (accessed 30th April 2019).
42. Yacoubi, A.E.; Massit, A.; Moutaouikel, S.E.; Rezzouk, A.; Idrissi, B.C.E. Rietveld Refinement of the Crystal Structure of Hydroxyapatite Using X-ray Powder Diffraction. *Am. J. Mater. Sci Eng* **2017**, *5*, 1–5. <https://doi.org/10.12691/ajmse-5-1-1>.
43. ASTM (American Society for Testing and Materials) C37388. Available online: [https://www.astm.org/DIGITAL\\_LIBRARY/index.html](https://www.astm.org/DIGITAL_LIBRARY/index.html) (accessed 30 April 2019).
44. Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
45. Goodhew, P.J.; Humphreys, J.; Beamland, R. *Electron Microscopy and Analysis*, 3th Edition. Taylor & Francis, London, England, 2001. <https://doi.org/10.1201/9781482289343>.
46. Thangamani, N.; Chinnakali, K.; Gnanam, F.D. The effect of powder processing on densification, microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite. *Ceram. Int* **2001**, *28*, 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0272-8842\(01\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0272-8842(01)00102-X).
47. Muralithran, G.; Ramesh, S. The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite, *Ceram. Int* **2000**, *26*, 221–230. [https://doi.org/10.1016/S0272-8842\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0272-8842(99)00046-2).
48. Hench, L.L.; Ethridge, E.C. *Biomaterials an interfacial approach*, Press New York, 1992. <https://doi.org/10.1002/pol.1983.130210815>.
49. Hulbert, S.F.; Young, F.A.; Mathews, R.S.; Klawitter, J.J.; Talbert, C.D.; Stelling, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* **1970**, *43*, 433–456. <https://doi.org/10.1002/jbm.820040309>.
50. Berzina-Cimdinam, L.; Borodajenko, N. Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*. Theophile, T.; InTech, 2012, pp. 123–148. Available online: <https://www.intechopen.com/chapters/36171> (accessed 15th September 2019).

51. Meejoo, S.; Maneepprakor, W.; Winotai, P. Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochim Acta* **2006**, *447*, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.04.013>.
52. Rehman, I.; Bonfield, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J. Mat. Sci: Mat. Med.* **1997**, *8*, 1–4. <https://doi.org/10.1023/a:1018570213546>.
53. Penel, G.; Leroy, G.; Rey, C.; Bres, E. Microraman spectral study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int* **1998**, *63*, 475–481. <https://doi.org/10.1007/s002239900561>.
54. Cuscó, R.; Guitián, F.; Aza, S.D.; Artús, L. Differentiation between hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate by means of  $\mu$ -Raman spectroscopy. *J. Eur Ceram. Soc.* **1998**, *18*, 1301–1305. [https://doi.org/10.1016/s0955-2219\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/s0955-2219(98)00057-0).
55. Zhang, J.; Dai, C.; Wei, J.; Wen, Z.; Zhang, S.; Lin, L. Calcium phosphate/chitosan composite coating: Effect of different concentrations of Mg<sup>2+</sup> in the m-SBF on its bioactivity. *App Surf. Sci* **2013**, *280*, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.04.144>.
56. Bose, S.; Sarkar, N.; Banerjee, D. Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. *Mater. Today Chem* **2018**, *8*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.03.005>.
57. Liang, L.; Rulis, P.; Ching, W.Y. Mechanical properties, electronic structure and bonding of alpha- and beta-tricalcium phosphates with surface characterization. *Acta Biomater* **2010**, *6*, 3763–3771. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.033>.
58. Zhang, X.; Liao, Z.; Yang, L.; Hu, Z.; Jiang, K.; Guo, Y. Interaction between  $\beta$ -cyclodextrin and crystallization of calcium carbonate. *Acta Chim Sinica* **2003**, *61*, 69–73.
59. Wang, S.; Wang, Y.; Sun, K.; Sun, X. Low temperature preparation of  $\alpha$ -tricalcium phosphate and its mechanical properties. *Process. Appl Ceram.* **2017**, *11*, 100–105. <https://doi.org/10.2298/PAC1702100W>.
60. Pasquinelli, H.B.A. Compósito de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio  $\beta$ HAp-PNB na forma de arcabouço induz regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. PhD thesis, Programa de Pós graduação em Odontologia Integrada - Universidade Estadual de Maringá, June, 2015.
61. Bonadio, T.G.B. Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcio: Produção, caracterização e estudos in vivo como suportes ósseos densos e porosos, PhD thesis, Programa de Pósgraduação em Física - Universidade Estadual de Maringá, September, 2014. Available online: [www.pfi.uem.br](http://www.pfi.uem.br) (accessed 30th April 2019).
62. Zhang, F.; Liu, F.; Zhang, G.; Li, J.; Xinjun, S. Protective Effect of Curcumin on Bone Trauma in a Rat Model via Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells. *Med Sci Monit* **2020**, *26*, e924724:1–9. <https://doi.org/10.12659/MSM.924724>.
63. Canalis, E.; Economides, A.N.; Gasserro, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Ver.* **2003**, *24*, 218–235. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0023>.
64. Welch, R.D.; Jones, A.L.; Bucholz, R.W.; Reinert, C.M.; Tjia, J.S.; Pierce, W.A.; Wozney, J.M.; Li, X.J. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 1483–1490. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.9.1483>.
65. Notoya, M.; Nishimura, H.; Woo, J.T.; Nagai, K.; Ishihara, Y.; Hagiwara, H. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. *Eur J. Pharmacol.* **2006**, *534*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.028>.

**ARTICLE 2**  
**CAPÍTULO DO E-BOOK “COMPOSTOS BIOATIVOS E SUAS APLICAÇÕES”**  
**PUBLICADO PELA EDITORA MÉRIDA PUBLISHERS**

**Sulfato de condroitina: obtenção a partir de resíduos das agroindústrias e seus benefícios para a saúde humana**

Cecilia Valente Rodrigues Truite<sup>1\*</sup>, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: ceciliatruite@gmail.com

Hâmara Milaneze de Souza<sup>2</sup>, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: hmilaneze@hotmail.com

Tieles Carina de Oliveira Delani<sup>3</sup>, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: tielesfar@yahoo.com.br

Graciette Matioli<sup>4</sup>, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: gracietteuem@gmail.com

\* Autor para correspondência: ceciliatruite@gmail.com

### **Resumo**

As agroindústrias produzem grandes quantidades de resíduos que, se não geridos corretamente, podem suscitar uma série de impactos, tanto ambientais como de saúde pública. O beneficiamento e processamento desses resíduos mostram-se como uma grande oportunidade de desenvolvimento de subprodutos, transformando-os em outros produtos comercializáveis. Segundo a Associação Brasileira de Reciclagem Animal (ABRA), em 2019 o Brasil processou mais de 11 milhões de toneladas de resíduos bovinos, suínos e subprodutos de aves, sendo aproveitados, principalmente, aparas de tecidos animais, cartilagens, sebo e

ossos. O sulfato de condroitina (SC), polímero natural, solúvel em água, de alto valor agregado, constituído de cadeias repetidas de mucopolissacarídeos, e encontrado nas cartilagens de aves e maioria dos mamíferos, pode ser utilizado na indústria de medicamentos, alimentos, cosméticos, entre outros. Na forma medicamentosa, o SC apresenta ação anticâncer, antioxidante e anti-inflamatória, atuando na reparação e regeneração óssea. Ainda dentro da medicina, apresenta atividade promissora no campo da oftalmologia. No ramo da estética, pode ser utilizado na engenharia de tecidos da pele, com efeitos positivos no rejuvenescimento facial, além de seu uso em nanotecnologia, atuando na distribuição controlada de fármacos. Considerando os benefícios do SC para saúde humana, essa revisão irá explanar a respeito desse ativo largamente utilizado nas indústrias e com diversos benefícios para o homem. Também delineará a importância do aproveitamento dos resíduos de abate de animais na redução do impacto negativo sobre o meio ambiente e na sua transformação em outros produtos comercializáveis, podendo gerar produtos altamente rentáveis para a indústria.

**Palavras-chave:** Cartilagem, Osteoartrite, Reciclagem, Resíduos agroindustriais, Sulfato de condroitina.

## **1. Introdução**

O processamento de alimentos resulta em uma fração de resíduos que, devido as suas características orgânicas, merecem toda a atenção das autoridades de vigilância sanitária e ambiental. O problema da destinação dos resíduos de origem animal, tais como restos de carnes, aparas de tecido animal, cartilagens, sebo e ossos, se não destinados corretamente, podem gerar uma série de impactos, tanto ambientais como de saúde pública, sendo necessária uma gestão adequada dos mesmos. Dessa forma, quanto melhor o aproveitamento desses resíduos, transformando-os em outros produtos comercializáveis, menor será o impacto sobre o meio ambiente e maior será a valorização do sacrifício animal [1]. Dentre os diversos processos de aproveitamento, a reciclagem de produtos cárneos torna-se uma metodologia

relevante para a indústria quando gera subprodutos de alto valor agregado, como o sulfato de condroitina (SC).

O sulfato de condroitina é um heteropolímero aniônico linear de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina. É encontrado nas cartilagens da maioria dos mamíferos, sendo que as posições mais comuns do radical sulfato (que determina qual o isômero formado) são o carbono 4 e 6 da N-acetil-D-galactosamina, resultando assim a condroitina-4-sulfato ou a condroitina-6-sulfato, respectivamente [2].

Na forma medicamentosa, apresenta ação antioxidante e anti-inflamatória, atuando na reparação óssea durante o processo de ossificação, sendo largamente utilizada no tratamento da osteoartrite. Apresenta grande potencial na melhora da regeneração óssea. Ainda dentro da medicina, apresenta-se como opções promissora no campo da oftalmologia e estética, além de seu uso em nanotecnologia, atuando na distribuição controlada de fármacos.

Esta revisão irá abordar o tema relacionado ao aproveitamento dos resíduos gerados pela agroindústria e seu impacto sobre o meio ambiente, além da transformação destes em produtos que apresentam valor agregado significativo, como é o caso do sulfato de condroitina, que pode ser obtido por meio de resíduos do abate de animais e que apresenta diversos benefícios para a saúde.

## **2. Gerenciamento de resíduos agroindustriais**

O descarte inadequado de resíduos sólidos tem gerado preocupações à sociedade e aos órgãos competentes. O gerenciamento ineficiente desses resíduos apresenta alto grau de agravamento dos problemas ambientais em vários municípios brasileiros. O desenvolvimento tecnológico e incentivo ao setor agroindustrial tem gerado e lançado no ambiente toneladas de resíduos advindos tanto das práticas agrícolas, como da pecuária e da agroindústria, aumentando exponencialmente nos últimos anos [3].

Atualmente, as indústrias estão preocupadas em alcançar e apresentar o correto gerenciamento dos resíduos de acordo com a política adotada pelas empresas, controlando os impactos sobre o meio ambiente que as atividades, produtos e serviços podem causar. Devem atuar dentro do contexto da legislação

vigente, que a cada dia torna-se mais exigente, do desenvolvimento de políticas econômicas, das medidas de proteção ao meio ambiente e da crescente preocupação relacionada aos assuntos ambientais e ao desenvolvimento sustentável [4].

Em 2019, segundo a Associação Brasileira de Reciclagem Animal (Abra), o Brasil processou mais de 11 milhões de toneladas de resíduos bovinos, suínos e subprodutos de aves, movimentando cerca de R\$ 8,3 bilhões, contribuindo para a redução do impacto ambiental causado pela destinação inadequada de resíduos *in natura*, evitando, a proliferação de doenças, bactérias e vírus [5].

Se não geridos corretamente, os resíduos de abatedouros podem causar graves problemas ambientais. A maioria destes resíduos são altamente putrificáveis, podendo acarretar contaminações e odores se não processadas rapidamente. Observado pelo lado econômico e ambiental, a maioria dos resíduos gerados no abate animal pode ser transformado em produtos comerciais, incluindo os comestíveis (destinados à alimentação humana), semiprocessados (utilizados como matéria-prima de outro produto alimentício) ou destinados a outras aplicações, tais como farinhas para ração animal, produtos farmacêuticos, cosméticos, entre outros [6,7].

Segundo Pardi *et al.* [7], as fontes e os resíduos das indústrias de carne podem ser agrupados, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Fontes e resíduos decorridos do abate de bovinos, suínos e aves.

<b>FONTES</b>	<b>RESÍDUOS DESPEJADOS</b>
<b>Curral</b>	Esterco
<b>Sala de abate</b>	Sangue, resíduos de carne, cartilagens e gordura
<b>Depilação, depenagem</b>	Pelos, penas e materiais terrosos
<b>Tripária, bucharia</b>	Conteúdo de estômagos, intestinos, gordura
<b>Preparo de carcaças</b>	Resíduos de carne, gordura, cartilagens e sangue
<b>Fusão de gordura</b>	Líquidos ricos em gordura
<b>Subprodutos</b>	Gorduras e resíduos não comestíveis

Fonte adaptada [7].

Para as agroindústrias alcançarem um sistema de tratamento de resíduos eficaz, a adequada destinação destes é essencial para que os objetivos sejam totalmente alcançados. Como as agroindústrias processam diferentes produtos de origem animal e vegetal, estas geram uma grande variedade de resíduos, que podem ser destinados a diferentes processos de aproveitamento. Segundo [10], as principais formas de destinação dos resíduos de origem animal incluem aterros, enterramento, compostagem, queima, incineração e reciclagem [8-10].

Na agricultura, a metodologia da reciclagem tem se destacado como uma das melhores opções de utilização dos resíduos, tanto pela maior facilidade em estar de acordo com as normas sanitárias e ambientais, como pela viabilidade econômica, desde que os resíduos atendam padrões mínimos de qualidade [11].

A opção menos indicada para a destinação dos resíduos são os aterros, pois a lenta decomposição orgânica não atinge a temperatura ideal para eliminação das bactérias e esporos resistentes ao calor, favorecendo a proliferação de roedores e insetos, odores desagradáveis, gases inflamáveis (metano) e a possibilidade de contaminação de aquíferos pelo chorume. O aterramento, apesar de ser uma utilizada a séculos para a disposição final de animais, gera preocupações sobre possíveis contaminações de águas subterrâneas e outros fatores ambientais, sendo uma prática banida em alguns estados brasileiros [10].

A compostagem é um processo de reciclagem e aproveitamento dos resíduos gerados, estabilizando a matéria orgânica em formas mais simples, com redução de sólidos, massa e volume, além de gerar fertilizantes orgânicos. Este processo ocorre basicamente em três fases, a mesófila, a termófila e de maturação, que determinam os intervalos de temperatura no processo de compostagem, as quais são caracterizadas por diferentes grupos de microorganismos [12,13].

A queima de carcaças e outros tecidos não são compatíveis com o meio ambiente devido a liberação de dioxinas, odores desagradáveis e outros poluentes atmosféricos [14].

Para a estabilização e eliminação de materiais perigosos, como as carcaças de animais mortos, principalmente em países onde ocorre a encefalopatia espongiforme bovina, conhecida como a doença da vaca louca, a incineração mostra-se como um processo ideal para eliminação destes,



convertendo matéria orgânica em inorgânica e eliminando quaisquer tipos de organismo patogênico [10].

A reciclagem apresenta-se como melhor via de destinação, tanto ambiental e de saúde pública como econômica, acentuando a qualidade ambiental e os ciclos biológicos e, portanto, é a forma mais viável de disposição final dos resíduos. Este processo consiste na transformação de restos animais em sebos, óleos, farinhas, adubos, matérias-primas para indústria de medicamentos e cosméticos, entre outros. Segundo [14], reciclar resíduos de origem animal contribui com o conceito Zero (que conduz à emissão zero), ou seja, que os resíduos de uma indústria constituem matéria-prima de outra seguinte na cadeia produtiva, implicando em aumento dos conhecimentos sobre os possíveis usos dos resíduos e suas respectivas formas de aproveitamento e tratamento [14,15].

### **3. Sulfato de condroitina**

O SC é um polímero natural solúvel em água altamente purificado de cadeias repetidas de moléculas denominadas mucopolissacarídeos, sendo um dos principais componentes da matriz extracelular de muitos tecidos conjuntivos, incluindo cartilagem, osso, pele, ligamentos e tendões. É uma glicosaminoglicana monossulfatada de cadeia longa, sendo que seu comprimento médio pode variar de um tecido para outro ou mesmo dentro do mesmo tecido. Em geral, a massa molecular das cadeias de SC pode diminuir com o avançar da idade, estresse ou danos na cartilagem articular [16-19].

O SC é um heteropolímero aniônico linear de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina. O primeiro a descrever o SC foi Levene em 1925, propondo que seus constituintes eram o ácido D-glicurônico, D-galactosamina, ácido acético e sulfúrico. Porém, a estrutura correta foi elucidada posteriormente, sendo constituída por unidades repetidas de  $\beta$ 1-4 ácido-D-glicurônico e  $\beta$ 1-3 N-acetil-D-galactosamina. Além disso, demonstrou-se que nos mamíferos as posições mais comuns do radical sulfato (que determina qual o isômero formado) são o carbono 4 e/ou 6 da N-acetil-D-galactosamina, resultando assim a condroitina-4-sulfato ou a condroitina-6-sulfato, respectivamente [2,20,21].

A condroitina-4-sulfato é conhecida como SC A e a condroitina-6-sulfato de SC C (Fig. 2). O SC B é o sulfato de dermatana, apresentando algumas diferenças estruturais. Dentre essas diferenças tem-se a 5-epimerização do ácido D-

glicurônico a ácido L-idurônico e a O-sulfatação no C4 e C6 da N-acetil-D-galactosamina e no C2 do ácido L-idurônico. Além disso, uma forma desse composto pode ser não-sulfatada, sendo que estes isômeros apresentam distribuição diferenciada entre os tecidos, dependendo da idade e do estado de saúde do organismo [21-23].

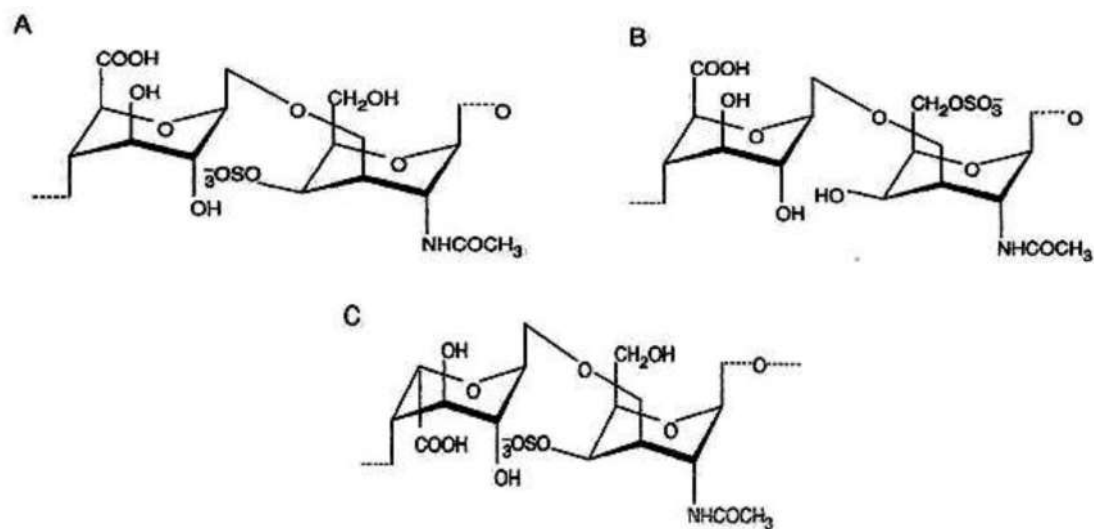


Figura 2: Estrutura química do Sulfato de Condroitina [24].

As cadeias de SC possuem carga negativa, devido à presença de enxofre. São moléculas hidrofílicas, que capturam moléculas de água, dando a cartilagem característica de uma esponja. Assim, quando a articulação está relaxada, a cartilagem tem a capacidade de absorver o líquido sinovial presente na cápsula articular. Quando comprimida, este é espalhado pela articulação promovendo a lubrificação, nutrição e eliminação de substâncias. Assim, é um importante constituinte da matriz extracelular da cartilagem, conferindo desejáveis propriedades mecânicas para a mesma [18,25,26].

Atualmente, diversas metodologias existem para extrair e isolar o SC a partir de tecidos animais. Geralmente é realizada a digestão enzimática dos tecidos para extração das proteoglicanas e posterior purificação do SC, variando principalmente fatores como temperatura, pH, concentração das enzimas e tempo necessário para cada reação de acordo com o tipo e origem do tecido. Dentre os subprodutos gerados nas agroindústrias de abate animal e que podem ser utilizados na produção do SC, é possível citar a cartilagem de peixes, esterno de aves, a cartilagem da escápula e traqueia bovina e suína, entre outros [21].

O SC apresenta benefícios em diversas doenças, tanto isolado como combinado com outras substâncias ativas. Evidências, que serão citadas a seguir, mostram esses benefícios na reparação óssea, no tratamento da osteoartrite, em cirurgias de cataratas na oftalmologia, além de sua ação antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer. No ramo da estética, pode ser utilizado na engenharia de tecidos da pele, com efeitos positivos no rejuvenescimento facial, além de seu uso em nanotecnologia, atuando na distribuição controlada de fármacos.

### **3.1 Osteoartrite**

A osteoartrite é a mais frequente causa de doença crônica musculoesquelética afetando principalmente quadris, joelhos, mãos e pés, sendo caracterizada pela perda de cartilagem, remodelação óssea e inflamação da membrana sinovial. É considerada a maior causadora de limitação das atividades diárias na população idosa. Na osteoartrite, a degradação da cartilagem e a proliferação sinovial resultam em dor e rigidez das articulações. O SC proporciona benefícios como redução da deterioração da cartilagem, melhorando dores e inflamação local [27,28].

O SC aumenta a produção do ácido hialurônico presente no líquido sinovial, mantendo a viscosidade deste, estimulando o metabolismo dos condrócitos, aumentando síntese de colágeno e proteoglicanos. Além disso, é caracterizado pelo início lento de ação, porém com uma eficácia global na redução de sintomas de osteoartrite semelhantes aos anti-inflamatórios e com menores efeitos adversos. Inibe a deterioração da cartilagem e ajuda a manter o equilíbrio entre os processos de catabolismo e anabolismo da cartilagem, melhorando a função motora da articulação, reduzindo dores e inflamações. Seu uso tem sido associado ao aumento da densidade mineral óssea, além de ser responsável por reduzir o risco de ocorrência de fraturas [29,30,31]

A Tabela 2 apresenta alguns estudos clínicos mostrando os efeitos positivos do SC no manejo da osteoartrite

Tabela 2: Estudos mostrando a eficácia do SC na osteoartrite.

Estudo	Investigação	População e duração	Resultados
<b>Reginster JY et al [32].</b>	SC 800mg/dia x celecoxibe 200mg/dia x placebo.	604 pacientes com osteoartrite nos joelhos. Investigação por 6 meses.	O tratamento com SC e celecoxibe reduz a escala VAS e LI, aumenta o MCII, com melhora evidente dos sintomas da doença.
<b>Pelletier JP et al [33].</b>	SC 1200mg/dia x celecoxibe 200mg/dia.	138 pacientes com osteoartrite nos joelhos. Investigação por 24 meses.	SC proporcionou menor perda de volume da cartilagem <i>versus</i> celecoxibe. SC e celecoxibe reduz incidência do inchaço e efusão articular e melhora a dor, função articular e qualidade de vida.
<b>Kahan et al [34].</b>	CS 800mg/dia x placebo.	22 pacientes com osteoartrite. Investigação por 104 semanas.	CS melhora os sintomas da dor, de acordo com a escala VAS e subescala de dor do índice WOMAC <i>versus</i> placebo.

SC = sulfato de condroitina; VAS = escala análoga visual; LI = índice Lequesne; MCII = melhora mínima clinicamente importante; WOMAC = McMaster Universities Osteoarthritis Index

De acordo com Reginster et al [32], a utilização do SC apresenta resultados semelhantes a anti-inflamatórios como o celecoxibe no manejo da osteoartrite, reduzindo a dor e melhorando a função articular ao longo de seis meses de tratamento, podendo ser considerado uma terapia de primeira linha na melhora da doença.

O impacto positivo do sulfato de condroitina no tratamento da osteoartrite foi confirmado por estudos de revisão, demonstrando resultados favoráveis

quando comparados ao placebo. A sua associação com o sulfato de glucosamina demonstra efeito sinérgico, na qual um melhora a eficácia do outro. A própria natureza dos dois atua como componentes estruturais da cartilagem, suportando fortemente a hipótese de prevenção ou início tardio da doença. Além de auxiliar na redução da dor, pesquisas demonstraram que, por si só ou em combinação, ambos retardaram a progressão da degeneração das articulações, estimulando a produção de nova cartilagem, aumentando o espaço da articulação (ou reduzindo o estreitamento do espaço articular), com atividade anti-inflamatória e melhorando a mobilidade, desempenhando papel importante no retardo do desenvolvimento da osteoartrite [35,36].

### **3.2 Regeneração óssea**

Na regeneração óssea, os glicosaminoglicanos sulfatados, como é o caso do SC, se ligam diretamente aos receptores na superfície dos osteoblastos ou matriz óssea, como a integrina e nas células pré-osteoclásticas e inibe a diferenciação em osteoclastos, regulando a diferenciação óssea. O SC tem potencial no tratamento de defeitos ósseos, principalmente quando está combinado com compósitos a base de fosfato de cálcio. Em relação ao mecanismo de ação, observa-se principalmente o efeito inibitório do SC na diferenciação de osteoclastos [37,38].

Para melhorar a regeneração óssea, é interessante a adição de fatores osteogênicos ou osteoindutores. O SC está envolvido na formação e mineralização óssea, auxiliando na ligação de osteoblastos e osteoclastos à matriz óssea, além de interagir com células ósseas via integrinas ou receptores específicos da superfície celular, influenciando o crescimento, a migração e a diferenciação celular. Além disso, sua incorporação aos biomateriais utilizados para defeitos ósseos contribuiu para melhorar a remodelação óssea e aumentar a formação de osso novo [38].

Estudo demonstrou que o uso do SC em associação a fatores de crescimento como a BMP-4 (proteína morfogenética óssea-4), além de aumentar a formação óssea, promoveu o aumento da mineralização das células. Também, observou-se maior grau de formação óssea quando foi utilizado implante de titânio com SC tanto sozinho como associado ao BMP-4 [37].

A sulfatação das glicosaminoglicanas, como o SC, apresentou capacidade em controlar a homeostase das células ósseas e, ao mesmo tempo, promoveu a osteogênese, com um perfil favorável na remodelação óssea [39].

### 3.3 Oftalmologia

Wang et al [40] estudaram o efeito de reticulação do sulfato de condroitina em modelo de ceratocone em córnea de coelhos. Os resultados demonstraram que a utilização do SC pode tratar ou prevenir qualquer ectasia da córnea, melhorando a mecânica normal e restaurando a densidade e o alinhamento do colágeno nas córneas, sem causar apoptose extensa de ceratócitos e suprarregulação do gene pró-inflamatório.

A ceratoconjuntivite seca é caracterizada por secura crônica e bilateral da córnea e da conjuntiva, devido principalmente a um filme lacrimal inadequado. Dentre os principais sintomas, pode-se incluir coceira, queimação, irritação e fotofobia. O SC, devido a sua alta viscosidade e capacidade de se manter por mais tempo na superfície ocular, auxilia na redução dos sintomas relacionados a ceratoconjuntivite seca, sendo utilizado desde a década de 80 como lubrificante ocular no tratamento sintomático da insuficiência lacrimal [41].

Outra utilização do SC é no tratamento para úlceras de córnea, apresentando efeito de restauração devido ao estímulo da síntese de proteoglicanos, além de reduzir o processo inflamatório e inibir a plasmina, uma enzima fibrinolítica encontrada nas córneas lesadas [42,43]. Ranzani *et al* [44] realizaram um estudo no tratamento de úlcera de córnea induzida em coelhos, mostrando que a utilização de um colírio contendo 20% de SC e 0,3% de ciprofloxacino apresentou sinais clínicos semelhantes ao tratamento apenas com colírio de ciprofloxacino 0,3%, porém com melhora significativa da organização do tecido estromal, caracterizando sua ação sobre o tecido composto por colágeno.

A vitrectomia é um procedimento cirúrgico em que o humor vítreo é acessado, podendo ser substituído por um gás ou líquido. Apesar de ser usado em diversos problemas oftálmicos, as indicações mais frequentes são o descolamento da retina e a hemorragia vítrea. Em 2020, Siegel et al [45], demonstraram que o uso intraoperatório de um colírio contendo 4% de sulfato de condroitina e 3% de hialuronato de sódio em cirurgia de vitrectomia está associado a menos inchaço da córnea, sendo particularmente importantes em casos onde

são difíceis de minimizar os fatores que levam ao aumento edema da córnea, como pressões intraoculares mais altas e tempos operatórios mais longos.

Outra utilização do SC em oftalmologia é a preservação de córneas para transplantes. Antes do procedimento, as córneas explantadas devem ser armazenadas, sendo que o uso de conservantes com SC e dextrana são amplamente utilizados, mantendo a barreira endotelial funcional e a viabilidade do endotélio em até 21 dias [46,47].

### **3.4 Estética**

O envelhecimento é um processo natural, e a pele um marcador ideal da idade cronológica, sendo sua aparência determinada principalmente pela sua textura, coloração, elasticidade, produção de sebo, entre outros. Por ser um órgão exposto, a pele está sujeita aos danos ambientais, especialmente os causados pelas radiações ultravioletas, radicais livres, componentes tóxicos e alérgicos, danos mecânicos e por fatores endógenos, como predisposição genética, estado imune e hormonal e estresse [48].

O SC, clinicamente apresenta potencial na regeneração da pele, sugerindo que este melhora o envelhecimento epitelial. Estudo mostrou que o tratamento com SC aumentou a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, além de estimular a migração e síntese de componentes da matriz extracelular. Uma análise utilizando um modelo de ferida de pele e um de pele envelhecida revelou que o SC induziu a expressão do procolágeno do tipo I, promovendo a cicatrização e regeneração de feridas de pele [49,50].

Em indivíduos com fotoenvelhecimento facial, os níveis séricos de elastase 2, de neutrófilos, elastina e proteínas carboniladas estão aumentados, enquanto os níveis de ácido hialurônico e fibronectina estão reduzidos, sendo estes resultados associados a menor hidratação, tonicidade e elasticidade da pele, além de aumento do pH e sebo. A utilização oral de um suplemento a base de sulfato de condroitina, sulfato de glucosamina, colágeno, ácido hialurônico, pycnogenol e coenzima Q10 proporcionou melhora significativa na pontuação de fotoenvelhecimento, hidratação da pele, sebo e tonicidade mesmo após duas semanas após o término do período de 4 semanas de estudo [51].

### **3.5 Anti-inflamatório**

O SC apresenta ótima atividade anti-inflamatória, embora seja menos eficaz que certos anti-inflamatórios como a indometacina e o ibuprofeno, de acordo com as doses utilizadas. Uma das principais vantagens de utilizar o SC ao invés de anti-inflamatórios convencionais é que este não apresenta efeitos nocivos ao estômago, plaquetas e rins, e sua utilização pode ser mantida durante anos sem apresentar efeitos colaterais relevantes. Ressalta-se ainda que o SC apresenta maior ação em processos inflamatórios, enquanto sua atividade no aspecto vascular é menor. Estudos mostram que a atividade anti-inflamatória do SC pode ser confirmada pela alteração de parâmetros bioquímicos no líquido sinovial em pacientes com osteoartrite [52].

O SC apresenta capacidade em reduzir os processos inflamatórios, atuando na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B), que está intimamente associado aos biomarcadores sanguíneos da inflamação, principalmente a interleucina (IL)-1, IL-6 e proteína C reativa [53].

Essas citocinas pró-inflamatórias regulam as respostas inflamatórias e imunes e desempenham um papel importante na artrite, sendo que em modelos da doença são encontradas de forma consistente a expressão da IL-1 $\beta$  e IL-6, além de outras citocinas pró-inflamatórias importantes e quimiocinas. Particularmente, a IL-1 $\beta$  promove a destruição da cartilagem e do osso, enquanto a IL-6 é produzida por células capazes de estimular a resposta inflamatória [54]. A administração do SC apresenta a capacidade em reduzir de forma significativa a produção dessas citocinas pró-inflamatórias em toda a fase aguda, como no período crônico. Devido a sua capacidade em diminuir as citocinas pró-inflamatórias, o SC também reduz a concentração de proteína C reativa no plasma [55].

Com relação aos neutrófilos, considerados importantes em modelos de inflamação, o SC foi capaz de reduzir a atividade fagocítica e a explosão oxidativa intracelular dos mesmos [56].

### **3.6 Antioxidante**

Os glicosaminoglicanos, principalmente o SC e o ácido hialurônico, mostram propriedades antioxidantes, tanto *in vitro* quanto modelos experimentais *in vivo*. Existem várias hipóteses sobre o mecanismo antioxidante do SC. Karlsson



et al. [57] descobriram que os glicosaminoglicanos sulfatados eram responsáveis pela ligação da superóxido dismutase extracelular (E-SOD), sugerindo que o complexo pode proteger as células de mamíferos contra os danos dos radicais livres.

O SC tem a capacidade de prevenir a oxidação do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), HDL (lipoproteína de alta densidade) e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) por metais como o cobre, de inibir a peroxidação lipídica, principal mecanismo capaz de destruir membranas celulares e gerar novas espécies de radicais livres, além de restaurar os antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GSH), glutathione peroxidase (GPx), vitamina E, entre outros. Ao reduzir as reações oxidativas, o SC limita os danos e degradações ao DNA [58].

### **3.7 Anticancer**

O SC também pode ser usado diretamente como agente anticancerígeno ou como alvo no tumor para outros quimioterápicos e pode ser desenvolvido como uma nova classe de agentes terapêuticos. Apresenta capacidade de interagir com fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e seus receptores de superfície celular. Desta forma, está envolvido no controle de diversos processos celulares, como adesão, proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular, conferindo efeitos antiangiogênicos durante a progressão do tumor [59].

Estudo *in vitro* sugeriu que a suplementação com SC e sulfato de glucosamina pode reduzir os riscos de câncer colorretal, reduzindo a proliferação e induzindo a apoptose de células cancerígenas, sem afetar as células normais [59, 60].

Os gliomas são a forma mais comum e maligna de tumores cerebrais, apresentando alta taxa de mortalidade. Estudo avaliou os efeitos de glicoproteínas e glicosaminoglicanos em culturas de células de glioma humano, demonstrando redução da proliferação celular em 40% na presença de SC e colágeno tipo I [61,62].

Além disso, no desenvolvimento de tumores, várias proteoglicanas (incluindo o SC) são expressas e depositadas na matriz extracelular durante o crescimento do tumor, participando da estrutura da matriz extracelular, modulando o comportamento das células. Foi sugerido a utilização do SC como alvo para

entrega de drogas anticâncer em lipossomas catiônicos, representando uma estratégia para evitar o crescimento local e metástases de células tumorais [63,64].

### **3.8 Nanotecnologia**

O revestimento de fármacos utilizando materiais poliméricos são frequentemente utilizados para obtenção de controle efetivo de liberação de fármacos das formas farmacêuticas, proporcionando ótima reprodutibilidade [65].

A utilização de revestimento das formas farmacêuticas apresenta diversas funções, incluindo disfarçar sabores/odores desagradáveis, melhorar a aparência da formulação, proteção dos ativos frente os fluidos gástricos, aumento de estabilidade, entre outras vantagens, sendo que a de maior interesse é o desenvolvimento de formas farmacêuticas revestidas para liberação de fármacos em sítios específicos com alto grau de especificidade [66,67].

Os materiais utilizados devem permitir acessibilidade das enzimas produzidas pela microflora colônica, garantindo a liberação do ativo no sítio alvo específico. O SC possui particularidades sugerindo que este apresenta potencial aplicação na formação de materiais, com resultados promissores no transporte de fármaco para liberação específica no intestino grosso, onde há bactérias anaeróbicas em abundância, as quais degradam o SC. Porém, sua elevada solubilidade é um dos fatores limitantes de sua aplicação, sendo que a modificação química a partir da reticulação é alternativa capaz de reduzir a elevada solubilidade sem comprometer a sua biodegradabilidade frente à microflora colônica (PI 0705572-2 A2) [68].

## **4. Considerações finais**

Os resíduos agroindustriais tem sido alvo de estudos por diversos anos, sendo realizadas pesquisas com o objetivo de encontrar meios conscientes e responsáveis para a utilização destes materiais. Do ponto de vista ambiental, atenuar o impacto causado pelos resíduos é considerado de alta importância, valorizando, assim, o meio ambiente e reduzindo o acúmulo de resíduos no ecossistema.

Dentro da indústria de abate animal, como matadouros, abatedouros e frigoríficos, que se enquadram nas agroindústrias, a geração de resíduos animais como vísceras dos animais abatidos, fragmentos cárneos, sangue, conteúdo intestinal, pelos, ossos, penas, gorduras e águas residuais é inerente à atividade de produção e comercialização de carne para consumo, podendo se tornar um grande desafio para o setor se não geridos corretamente, causando grandes impactos ambientais e sociais. Do ponto de vista econômico e ambiental muito destes produtos residuais podem ser transformados em subprodutos úteis para consumo humano e animal, indústria de rações ou fertilizantes, além de compostos ativos para a indústria de medicamentos, cosméticos, entre outros, agregando valor ao produto e, ainda, reduzindo os custos para tratamento dos resíduos, em caso de descarte.

O SC é um glicosaminoglicano presente na substância fundamental dos tecidos conjuntivos de vertebrados, principalmente nas cartilagens, sendo sua principal fonte os tecidos cartilaginosos que são considerados resíduos do abate animal. É uma excelente opção no tratamento das doenças articulares degenerativas, como a osteoartrite, sendo seu uso já consagrado em todo o mundo, com grande relevância na literatura médica internacional. Vale lembrar que o presente trabalho mostrou outros pontos positivos do SC, como suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes e suas propriedades benéficas no ramo da oftalmologia, como agente no combate ao câncer, além de seu uso na medicina estética. Portanto, o SC, ativo largamente utilizado e rentável para as indústrias, proporciona relevantes benefícios para saúde humana e é resultante do aproveitamento dos resíduos de abate de animais, proporcionando redução do impacto negativo dos mesmos sobre o meio ambiente.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

#### 4. Referências Bibliográficas

- [1] BARROS F.D., LICCO E.A. A reciclagem de resíduos de origem animal: uma questão ambiental. **Revista Nacional da Carne**. 31(365):166-172, 2007. <https://maua.br/files/artigos/a-reciclagem-de-residuos-de-origem-animal-uma-questao-ambiental.pdf>. Acesso em: 20 de maio de 2021.
- [2] LAMARI F.N., KARAMANOS N.K. Structure of chondroitin sulfate. *Adv. Pharmacol*, 53(33-48):2006. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(05\)53003-5](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53003-5).
- [3] ANTENOR S., SZIGETHY L. Resíduos sólidos urbanos no Brasil: desafios tecnológicos, políticos e econômicos. **IPEA - Centro de Pesquisa em Ciência, Tecnologia e Sociedade**. Julho 2020. <https://www.ipea.gov.br/cts/pt/central-de-conteudo/artigos/artigos/217-residuos-solidos-urbanos-no-brasil-desafios-tecnologicos-politicos-e-economicos>. Acesso em: 10 de julho de 2021.
- [4] ASSOCIAÇÃO Brasileira De Normas Técnicas. NBR ISO 14001 – **Sistema de gestão ambiental: especificação e diretrizes para uso**. Norma ABNT. Rio de Janeiro: ABNT. 2004. <http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasghislaine/iso-14001-2004.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2021.
- [5] GERALDES D. **Indústria de reciclagem animal garante sustentabilidade à produção**. São Paulo: Editora Stilo, 2020. <https://www.editorastilo.com.br/industria-de-reciclagem-animal-garante-sustentabilidade-a-producao/>. Acesso em: 07 de julho de 2021.
- [6] PACHECO J.W. **Guia técnico ambiental de graxarias**. São Paulo: CETESB, p. 76, 2008. <https://cetesb.sp.gov.br/consumosustentavel/wp-content/uploads/sites/20/2013/11/graxaria.pdf>. Acesso em: 24 de junho de 2021.
- [7] PARDI M.C. *et al.* **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2a ed. Goiânia: Editora da UFG, 2:988-1106, 2006.
- [8] REI E.F. *et al.* Alterações no pH, matéria orgânica e CTC efetiva do solo, mediante a aplicação elevadas doses de lodo de esgoto em diferentes intervalos de irrigação. **Revista Verde de Agroecologia e**

- Desenvolvimento Sustentável.** 4(2):31-38, 2009.  
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7466611.pdf>. Acesso em: 24 de junho de 2021.
- [9] EDVAN R.L., CARNEIRO M.S.S. Uso da digestiva bovina como adubo orgânico. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias.** 4(2):211-225, 2011.  
<https://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/download/1315/1455>. Acesso em: 24 de junho de 2021.
- [10] FRANCO D.A. Animal disposal – the environmental, animal disease, and public health related implications: an assessment of options. In: **California Department of Food and Agriculture Symposium.** Sacramento: 2002.
- [11] PIERRE F.C., ARAUJO S.M.F. Tratamento De Resíduos Em Frigorífico De Bovino Corte. **Tekhne e Logos.** 8 (4):81-93, 2017.  
<http://revista.fatecbt.edu.br/index.php/tl/article/download/499/334>. Acesso em: 30 de junho de 2021.
- [12] COSTA M.S.S.M. Caracterização dos dejetos de novilhos super precoces: reciclagem energética e de nutrientes. Tese de doutorado. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2005.
- [13] BRAGA J.R., BENEDITO P.F., HESPANHOL, I., LOTUFO CONEJO J.G., *et al.* Introdução à engenharia ambiental. [S.l: s.n.], 2002.
- [14] BELLAVÉR C. Inter-relações do beneficiamento dos subprodutos do abate com a produção animal, ambiente e economia no Brasil. In: **II Workshop sobre Subprodutos de Origem Animal na Alimentação**, São Paulo: p. 01-09, 2003.
- [15] PREZOTTO L.L. Uma concepção de agroindústria rural de pequeno porte. **Revista de Ciências Humanas.** 31:133-153, abril, 2002.  
<https://doi.org/10.5007/%25x>.
- [16] RICHY F. *et al.* Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. **Archive**

- Internacional of Medicine.** 163 (13):1514-1522, 2003.  
<https://doi.org/10.1001/archinte.163.13.1514>.
- [17] TOFFOLETTO O. *et al.* Pharmacokinetic profile of glucosamine and chondroitin sulfate association in healthy male individuals. **ACTA Ortopedica Brasileira.** 13(5):235-237, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522005000500005>.
- [18] LOPES L.C. *et al.* Propriedades de hidrogéis constituídos de quitosana e sulfato de condroitina na presença de teofilina intumescido sem diferentes pHs. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu-PR, 2009. <https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/308.pdf>. Acesso em: 25 de junho de 2021.
- [19] MOREIRA M.B. Efeitos da oxigenoterapia hiperbárica e do sulfato de condroitina-A associado ao sulfato de glucosamina na reparação óssea de coelhos. Tese de doutorado. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 2006.
- [20] ROSEMAN S. Reflections on glycobiology. **Journal of Biological Chemistry.** 276(45):41527-41542, 2001.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R100053200>
- [21] SANTOS C.V. Sulfato de condroitina: da matéria-prima à terapêutica. Monografia. Porto Alegre:Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- [22] CASU B. *et al.* Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. **Trends in Biochemical Sciences.** 13:221-225, 1998.  
[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90088-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90088-6)
- [23] BANKS W.J. **Histologia aplicada a veterinária.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1998, 658 p. 1998.
- [24] PAVÃO M.S.G., VILELA-SILVA, A.C., MOURÃO, P.A.S. Biosynthesis of chondroitin sulfate: from the early, precursor discoveries to nowadays, genetics approaches. **Advances in Pharmacology.** 53:117-140, 2006.  
[https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(05\)53006-0](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53006-0).
- [25] GARNJANAGOONCHORN W., WONGEKALAK L., ENKAGUL A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage.

- Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.** 46(5):465-471, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.019>.
- [26] FERNANDES L.L. Produção e Caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas. Monografia. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.
- [27] REZENDE, M.U., CAMPOS G.C., PAILO A.F. Current Concepts in Osteoarthritis. **Acta Ortopédica Brasileira.** 21(2):120-122, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522013000200010>.
- [28] SANTOS F.C., BERSANI A. L. F., MORAES N.S. Osteoarticular disease in the elderly. **Revista Brasileira de Medicina.** 70(12), 2013. [https://www.researchgate.net/publication/288048974\\_Osteoarticular\\_disease\\_in\\_the\\_elderly](https://www.researchgate.net/publication/288048974_Osteoarticular_disease_in_the_elderly). Acesso em: 01 de julho de 2021.
- [29] DAVID-RAOUDI M. *et al.* Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases: role of p38 and Akt. **Arthritis & Rheumatism.** 60(3):760–770, 2009. <https://doi.org/10.1002/art.24302>
- [30] JEROSCH J. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. **International Journal of Rheumatology.** 2011:969012, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/969012>.
- [31] CALAMIA V. *et al.* Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy.** 12(4):R138, 2010. <https://doi.org/10.1186/ar3077>.
- [32] REGINSTER J.Y. *et al.* Pharmaceutical-grade Chondroitin sulfate is as effective as celecoxib and superior to placebo in symptomatic knee osteoarthritis: the ChONDroitin versus CElecoxib versus Placebo Trial (CONCEPT). **Annals of the Rheumatic Diseases.** 76(9):1537-1543, 2017. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210860>.
- [33] PELLETIER J.P. *et al.* Chondroitin sulfate efficacy versus celecoxib on knee osteoarthritis structural changes using magnetic resonance imaging: a 2-year

- multicentre exploratory study. **Arthritis Research & Therapy**. 18(1):256, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1149-0>.
- [34] KAHAN A. *et al.* Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis & Rheumatology**. 60(2):524-33, 2009. <https://doi.org/10.1002/art.24255>.
- [35] JASVINDER A. *et al.* Chondroitin for osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 28(1):CD005614, 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005614.pub2>.
- [36] HUSKISSON E.C. Glucosamine and Chondroitin for Osteoarthritis. **Journal of International Medical Research**. 36(6):1161-79, 2008. <https://doi.org/10.1177/147323000803600602>.
- [37] TATSUYA M. *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Physiology**. 217(3): 769-777, 2008. <https://doi.org/10.1002/jcp.21557>.
- [38] FENBOA M. *et al.* Effects of alginate/chondroitin sulfate-based hydrogels on bone defects healing. **Materials Science and Engineering C**. 116:111217, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111217>.
- [39] SALBACH-HIRSCH J. *et al.* Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts. **Journal of Cellular Biochemistry**. 115(6):1101-1111, 2014. <https://doi.org/10.1002/jcb.24750>.
- [40] WANG X. *et al.* Chondroitin Sulfate-Based Biocompatible Crosslinker Restores Corneal Mechanics and Collagen Alignment. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 58(10):3887-3895, 2017. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21292>.
- [41] GEHLEN, Marcelo Luiz. Estudo da permeabilidade vascular aguda em coelhos submetidos à queimadura química e injeção subconjuntival de agentes pró e anti-inflamatórios. 2005. Tese de doutorado. Curitiba. Universidade Federal do Paraná, 2005.
- [42] BRANDÃO C.V.S. *et al.* Avaliação e tratamento de úlceras de córnea em cães. **Revista Nosso Clínico**. 34:24-26, 2003.



- [43] RANZANI J.J.T. *et al.* Avaliação do uso tópico de sulfato de condroitina A (Ciprovet) no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. **MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação.** 2(5):51-56, 2004. [https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/vetsmart-contents/Documents/DC/Labyes/Avaliacao\\_Uso\\_Topico\\_Sulfato\\_Condroitina\\_A\\_Ciprovet\\_Ulcera\\_Cornea\\_Coelhos\\_v02.pdf](https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/vetsmart-contents/Documents/DC/Labyes/Avaliacao_Uso_Topico_Sulfato_Condroitina_A_Ciprovet_Ulcera_Cornea_Coelhos_v02.pdf). Acesso em 05 de julho de 2021.
- [44] WOUK A.F.P.F. *et al.* Ação do sulfato de condroitina “A” associado à ciprofloxacina em úlceras de córnea em cavalos. **Revista Acadêmica Ciências Animal,** 4(4):11-20, 2006. <http://dx.doi.org/10.7213/cienciaanimal.v4i4.9465>.
- [45] SIEGEL D.T. *et al.* Effect of lubricants on corneal thickness after vitrectomy. **Retina.** 40(8):1616-1622, 2020. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002639>.
- [46] KIM K.S. *et al.* Corneal Endothelial Permeability of Human Tissue After Storage in Optisol. **American Journal of Ophthalmology.** 117(3):385-393, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)73150-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)73150-2).
- [47] MEANS T.L. *et al.* Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. **Archives of Ophthalmology.** 113(6):805-809, 1995. <https://doi.org/10.1001/archopht.1995.01100060131047>.
- [48] TOBIN D.J. Introduction to skin aging. **Journal Of Tissue Viability.** 26(1):37-46, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>.
- [49] CAMPO G.M. *et al.* Chondroitin Sulphate: Antioxidant Properties and Beneficial Effects. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** 6(12):1311-1320, 2006. <https://doi.org/10.2174/138955706778993012>.
- [50] MIN D. *et al.* Potential anti-ageing effect of chondroitin sulphate through skin regeneration. **International Journal of Cosmetic Science.** 42(5):520-527, 2020. <https://doi.org/10.1111/ics.12645>.
- [51] DI CERBO A. *et al.* A dietary supplement improves facial photoaging and skin sebum, hydration and tonicity modulating serum fibronectin, neutrophil

- elastase 2, hyaluronic acid and carbonylated proteins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B.** 144:94-103, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.025>.
- [52] RONCA F. *et al.* Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage.** 6(Suppl A):14–21, 1998. [https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(98\)80006-x](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(98)80006-x).
- [53] VOLPI N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology.** 19(6):299-306, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0098-0>.
- [54] KANNAN K., ORTMANN R.A., KIMPEL D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology.** 12(3):167–181, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2005.07.011>.
- [55] BAUEROVA K. *et al.* Chondroitin sulfate effect on induced arthritis in rats. **Osteoarthritis and Cartilage.** 19(11):1373–1379, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.08.006>.
- [56] Burmester G.R. *et al.* Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? **Arthritis & Rheumatology.** 40(1):5–18, 1997. <https://doi.org/10.1002/art.1780400104>.
- [57] KARLSSON K., LINDAHL U., MARKLUND S.L. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. **Biochemical Journal.** 256(1):29-33, 1988. <https://doi.org/10.1042/bj2560029>.
- [58] CAMPO G.M. *et al.* Antioxidant activity of chondroitin sulfate. **Advances in Pharmacology.** 53:417-431, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(05\)53020-5](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53020-5).
- [59] ARUNA R., RWIVOO B., ARUN G. Prebiotic Chondroitin Sulfate Disaccharide Isolated from Chicken Keel Bone Exhibiting Anticancer Potential Against Human Colon Cancer Cells. **Nutrition and Cancer.** 71(5):825-839, 2019. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1521446>.
- [60] IBANEZ-SANZ G. *et al.* Possible role of chondroitin sulphate and glucosamine for primary prevention of colorectal cancer. Results from the

- MCC-Spain study. **Scientific Reports**. 8(1):2040, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20349-6>.
- [61] SATHORNSUMETEE S. *et al.* Molecularly targeted therapy for malignant gliomas. **Cancer**. 110(1):13-24, 2007. <https://doi.org/10.1002/cncr.22741>.
- [62] CAPPELLARI A.R. Efeito de diferentes componentes da matriz extracelular sobre a ecto- 5'-nucleotidase, proliferação, adesão e migração celular na linhagem de células de glioma humano U138-MG. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre. Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- [63] WEGROWSKI Y., MARQUAT F.X. Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Tumor Progression. **Advances in Pharmacology**. 53:297-321, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(05\)53014-X](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53014-X).
- [64] LEE C.M. *et al.* Novel chondroitin sulphate-binding cationic liposomes loaded with cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells in vivo. **Cancer Research**. 62(15):4282-4288, 2002. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/62/15/4282.full-text.pdf>. Acesso em: 02 julho 2021.
- [65] TARVAINEN M. *et al.* Aqueous starch acetate dispersion as a novel coating material for controlled release products. **Journal of Controlled Release**. 96(1): 179-191, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.016>.
- [66] BASHAIWOLDU A.B., PODCZECK F., NEWTON J.M. Application of dynamic mechanical analysis (DMA) to determine the mechanical properties of pellets. **International Journal of Pharmaceutics**, 274(1-2):53-63, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.030>.
- [67] BECK R.C.R. *et al.* Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 16(6a): 1233-1240, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000700022>.
- [68] CAVALCANTE O.A. *et al.* **Materiais para revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais a base de sulfato de condroitina**. Depositante: Universidade Estadual de Maringá. BR n. PI0705572-2. Depósito: 21 nov.

2007 Publicado: 29 maio 2019. <http://www.nitpar.pr.gov.br/revestimento-de-formas-farmaceuticas-solidas-orais-a-base-de-sulfato-de-condroitina/>.

Acesso em: 03 jul. 2021.