



MARIANA AGOSTINI DE MORAES

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS MICRO E
NANOESTRUTURADOS CONTENDO FIBROÍNA DE SEDA COMBINADA A OUTROS
POLÍMEROS BIOCMPATÍVEIS PARA CONTATO COM CÉLULAS**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Engenharia Química

MARIANA AGOSTINI DE MORAES

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS MICRO E
NANOESTRUTURADOS CONTENDO FIBROÍNA DE SEDA COMBINADA A OUTROS
POLÍMEROS BIOCAMPATÍVEIS PARA CONTATO COM CÉLULAS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Doutor em Engenharia Química

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MARIANA AGOSTINI DE MORAES E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. MARISA MASUMI BEPPU

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marisa Beppu", is written over a horizontal line.

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M791o Moraes, Mariana Agostini de, 1985-
Obtenção e caracterização de materiais micro e nanoestruturados contendo fibroína de seda combinada a outros polímeros biocompatíveis para contato com células / Mariana Agostini de Moraes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biopolímeros. 2. Biomateriais. 3. Engenharia tecidual. 4. Filmes finos. 5. Hidrogel. I. Beppu, Marisa Masumi, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of micro and nanostructured materials containing silk fibroin combined with other biocompatible polymers for contact with cells

Palavras-chave em inglês:

Biopolymers
Biomaterials Tissue
engineering Thin
films Hydrogel

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

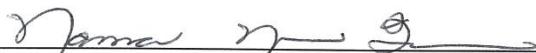
Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]
Diego Mantovani
Sergio Akinobu Yoshioka
Fernando Ely
Edvaldo Sabadini

Data de defesa: 18-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

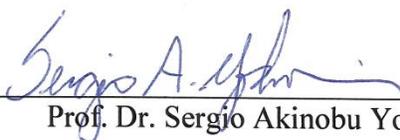
Tese de Doutorado defendida por Mariana Agostini de Moraes e aprovada em 18 de fevereiro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu - Orientadora



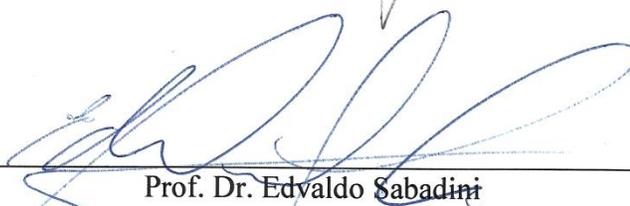
Prof. Dr. Diego Mantovani



Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka



Dr. Fernando Ely



Prof. Dr. Edvaldo Sabadini

RESUMO

Neste estudo, a fibroína de seda foi explorada no preparo de materiais micro e nanoestruturados, em estruturas bi- e tridimensionais, visando o uso em biomateriais. Para isto, foi estudada a incorporação de microfibras de fibroína em hidrogéis de colágeno, formando uma estrutura 3D, e a formação de filmes ultrafinos contendo fibroína pelo método *layer-by-layer*. No primeiro caso, a fibroína de seda foi explorada como um material promissor para reforçar mecanicamente os hidrogéis de colágeno devido às suas ótimas propriedades mecânicas e também por apresentar citocompatibilidade adequada com diversos tipos de células. Os resultados mostraram uma boa aderência entre as microfibras de fibroína e as fibrilas de colágeno, além de melhorias na resistência mecânica dos hidrogéis. Os hidrogéis contendo fibroína foram capazes não somente de manter o desempenho biológico do colágeno, mas de melhorar a proliferação celular. Os resultados obtidos sugerem que hidrogéis de colágeno podem ser microestruturados com fibroína de seda e representam um material promissor para uso em engenharia tecidual vascular. Já para o caso dos filmes ultrafinos (2D), foi estudada a formação dos mesmos através do método conhecido como *layer-by-layer*, pela técnica de imersão de substrato em solução polimérica. Como pares catiônicos foram estudados a quitosana e o hidrocloreto de poli(alilamina), sendo possível controlar a formação de fibrilas nanométricas de fibroína de seda através da variação do par polimérico. Fibrilas alinhadas de fibroína foram observadas no filme *layer-by-layer* com quitosana, porém no filme com hidrocloreto de poli(alilamina) não foram observadas fibrilas. A densidade de cargas do par polimérico é a principal característica que governa a formação de fibrilas na escala nanométrica. A etapa de secagem entre cada camada também é fundamental para a formação e estabilização dos filmes, que apresentaram coexistência de conformação molecular seda I e seda II. A viabilidade celular permaneceu entre 90 e 100% em todos os filmes estudados. Porém, o padrão de topografia imposto pelas fibrilas de fibroína não orientou o crescimento e a adesão celular. Filmes finos multicamadas nanoestruturados com fibroína de seda possuem aplicação potencial na área biomédica, como recobrimentos e superfícies funcionais.

ABSTRACT

In this study, silk fibroin was explored in the preparation of micro and nanostructured materials, in bi- and tridimensional structures, aiming the use in the biomaterials field. For that, the incorporation of fibroin microfibrils in collagen hydrogels forming a 3D structure was studied. We also studied the formation of ultrathin films containing fibroin by the layer-by-layer method. In the first case, the silk fibroin was explored as a promising material to mechanically reinforce collagen hydrogels due to its good mechanical properties and also for having cytocompatibility adequate with several cell types. The results showed a good adherence between fibroin microfibrils and collagen fibrils, as well as improvements in the mechanical resistance of the hydrogels. The hydrogels containing fibroin were capable to maintain the biological behavior of collagen and also to improve cell proliferation. The results suggest that collagen hydrogels can be microstructured with silk fibroin and represent a promising material for use in vascular tissue engineering. In the case of the ultrathin films (2D), the formation of these films was studied by the layer-by-layer method, using the technique of substrate dipping in a polymeric solution. Chitosan and poly (allylamine hydrochloride) were used as cationic pair species, being possible to control the formation of nanometric fibrils of fibroin by varying the polymeric pair. Fibroin aligned fibrils were observed in the layer-by-layer film with chitosan, while no fibrils were observed in the film with poly (allylamine hydrochloride). The charge density of the polymeric pair is the main characteristic that governs the fibrils formation at the nanometric scale. The drying step between each layer is also essential for formation and stabilization of the films that show the co-existence of molecular conformation of silk I and silk II. Cell viability between 90 and 100% was attained for all the studied films; however the topographic pattern imposed by the fibroin fibrils did not orient cell adhesion and growth. Multilayer thin films nanostructured with silk fibroin have potential for application in the biomedical field, as coatings and functional surfaces.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
ABREVIACÕES	xxv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Biomateriais e engenharia tecidual	3
3.2 Fibroína de seda	5
3.2.1 Fibrilas de fibroína de seda	9
3.3 Colágeno.....	10
3.4 Quitosana	12
3.5 Hidrocloro de poli(alilamina)	13
3.6 Hidrogéis	14
3.6.1 Hidrogéis e <i>scaffolds</i> de colágeno e fibroína de seda	15
3.7 Filmes ultrafinos obtidos pela técnica <i>layer-by-layer</i>	16
3.7.1 Filmes produzidos pela técnica <i>layer-by-layer</i> contendo fibroína	18
3.8 Histórico de colaboração entre os grupos de pesquisa	20
4 HIDROGÉIS DE COLÁGENO REFORÇADOS COM FIBROÍNA DE SEDA	24
4.1 Materiais e Métodos.....	25
4.1.1 Matérias-primas	25

4.1.2	Preparo das microfibras de fibroína de seda	25
4.1.3	Preparo da solução de colágeno	25
4.1.4	Preparo dos hidrogéis de colágeno com microfibras de fibroína	26
4.1.5	Caracterizações	27
4.1.5.1	<i>Caracterização morfológica</i>	27
4.1.5.2	<i>Caracterização mecânica</i>	28
4.1.5.3	<i>Caracterização biológica</i>	30
4.2	Resultados e Discussão	34
4.2.1	Morfologia.....	34
4.2.2	Propriedades mecânicas	37
4.2.2.1	<i>Resistência à tração</i>	37
4.2.2.2	<i>Resistência à compressão</i>	38
4.2.2.3	<i>Teste reológico</i>	40
4.2.3	Propriedades biológicas	42
4.3	Conclusão Parcial.....	51
5	FILMES NANOMÉTRICOS COM FIBROÍNA DE SEDA	52
5.1	Materiais e Métodos	54
5.1.1	Preparo das soluções de fibroína, quitosana e PAH	54
5.1.2	Preparo dos substratos.....	55
5.1.3	Preparo dos filmes pelo método <i>layer-by-layer</i>	56
5.1.4	Caracterizações	56
5.1.4.1	<i>Espessura e formação dos filmes</i>	57
5.1.4.2	<i>Caracterização morfológica</i>	60
5.1.4.3	<i>Caracterização química</i>	60
5.1.4.4	<i>Caracterização mecânica</i>	61

5.1.4.5 <i>Caracterização biológica</i>	62
5.2 Resultados e Discussão	64
5.2.1 Espessura e formação dos filmes	67
5.2.2 Caracterização morfológica.....	74
5.2.2.1 <i>Influência da solução utilizada para dissolver a fibroína</i>	74
5.2.2.2 <i>Influência do substrato e do par polimérico</i>	75
5.2.3 Caracterização química	82
5.2.4 Caracterização mecânica.....	86
5.2.5 Caracterização biológica	87
5.3 Conclusão Parcial.....	93
6 DISCUSSÃO FINAL.....	94
7 CONCLUSÃO	105
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

*A todos que acreditam na educação como
ferramenta de transformação*

AGRADECIMENTOS

À minha família, Érico, Simone e Daniel, por me dar liberdade e apoiar incondicionalmente meus sonhos.

Ao Nei, por tornar meus dias mais felizes e fazer a caminhada valer a pena.

À professora Marisa Masumi Beppu, pela confiança depositada em mim, por me abrir todas as portas imagináveis e pelo modelo de profissional que trabalha com ética e respeito ao próximo.

Ao professor Luis Antonio de Almeida Pinto, querido ex-orientador, por me mostrar que não há limites aos sonhos.

Aos professores Antonio Francisco Aimi e Antonio Beal, meus primeiros mestres, por despertar a minha curiosidade pela ciência.

A todos os colegas do LEQUIP, Raquel Weska, Mariana Silva, Fernanda Condi, Fernando Vasconcellos, Giovana Genevro, Cynthia Mahl, Thiago Taketa, Tiago Martins, Juliana Vaz, Bruno Cunha, Vicente Franco, Rogério Bataglioli, Rodrigo Rabelo, Reginaldo Gomes Neto e Victor Sarti, pelo companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Diego Mantovani, por me receber em seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste trabalho, contribuindo de forma significativa para a minha formação. Aos amigos do LBB (Laboratoire de Biomatériaux et de Bioingénierie) Vanessa Montañó, Eléonore Michel, Olivier Lesage, Sébastien Meghezi, Lucie Levesque, Afghany Mostavan, Marie Leroy e Pascale Chevalier, por tornarem os gelados dias em Québec mais amenos. Agradeço também à Estelle Partenotte, pela paciência e auxílio na realização dos testes biológicos.

Ao Prof. Michael Rubner, pela acolhida no MIT, por compartilhar seu conhecimento e enriquecer consideravelmente minha pesquisa. Ao Thomas Crouzier, pela ajuda com os testes com células. Aos colegas de laboratório Grínia Nogueira, Roberta Polak, Jonathan Gilbert, Rosanna Lim, Hyomin Lee, Jiyoun Ahn e Siddarth Srinivasan, pelas discussões científicas que permitiram a realização de parte desta tese.

Aos amigos e colegas de doutorado Andrea Krause Bierhalz, Carlos Alexandre Moreira da Silva, João Vinicius Silveira, Caroline Bertagnolli e Gabriela Silveira da Rosa, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pela risada fácil nos momentos de comemoração.

Ao professor Edvaldo Sabadini, por disponibilizar o uso do reômetro e ao aluno Thiago Ito, pela ajuda e disponibilidade nos testes reológicos. Ao professor Theo Guenter Kieckbusch, por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização dos testes mecânicos. À professora Mônica Cotta, por disponibilizar o microscópio de força atômica para as medidas de nanoindentação e à aluna Moniellen Monteiro, pela ajuda e paciência na realização das indentações.

Aos técnicos Celso Camargo, Kelly Palma e Adilson Brandão, pela ajuda na realização de algumas técnicas que foram utilizadas nesta tese.

Aos professores Theo Guenter Kieckbusch, Marcos Akira D'Ávila, Ângela Maria Moraes, Edvaldo Sabadini, Diego Mantovani, Sergio Akinobu Yoshioka e Fernando Ely, pela participação nos exames de qualificação I e II e na defesa da tese. Suas críticas e sugestões contribuíram para a minha formação e aperfeiçoaram esta tese.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro para a realização do doutorado no Brasil. À CAPES, modalidade PDSE, e ao Emerging Leaders of the Americas Program (ELAP) pelo apoio financeiro durante a realização do doutorado sanduíche nos Estados Unidos e Canadá, respectivamente.

Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A mágica presença das estrelas!

O Espelho Mágico - Mario Quintana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da fibroína de seda e representação esquemática da conformação folha- β . Adaptado de Silkwood silk TM (2011).	6
Figura 2: Modelo de auto-organização da fibroína formando agregados coloidais que se organizam formando fibrilas. Adaptado de Lu <i>et al.</i> (2012).....	10
Figura 3: Estrutura química do colágeno, constituído pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina (a) e representação esquemática da constituição da fibra de colágeno (b). Adaptado de Berg (2011) e Harris e Gonsalves (2011).	11
Figura 4: Estrutura química da quitosana. Fonte: Suh e Matthew (2000).	12
Figura 5: Estrutura química do hidrocloreto de poli(alilamina).	13
Figura 6: Representação esquemática da deposição de uma bicamada através da técnica de <i>layer-by-layer</i>	17
Figura 7: Vista superior do molde utilizado para preparo das amostras (a), vista lateral (b) e frontal (c) do aparato para realização do teste de tração em anéis.	29
Figura 8: Fotografias dos hidrogéis COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75(d).	34
Figura 9: Imagem de microscopia óptica (aumento de 2,5x) do hidrogel COL/SF50 (a) e imagem de MEV mostrando uma microfibrila de fibroína totalmente recoberta por fibrilas de colágeno (b).	35
Figura 10: Curva típica de tensão-deformação em teste de tração em anel dos hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína. As linhas pontilhadas verticais indicam a região da regressão linear.....	37
Figura 11: Resultado do teste de compressão confinada dos hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína.	39
Figura 12: Curvas de módulo de armazenamento G' (a) e módulo de perda G'' (b) em função da frequência.	41
Figura 13: Imagens de microscopia óptica dos dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d), no dia 0 (1), dia 1 (2), dia 3 (3) e dia 5 (4) de cultura.....	43
Figura 14: Fotografias dos dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d) no sétimo dia de cultura.	44
Figura 15: Perda de massa dos dispositivos devido à contração mediada por células.	45

Figura 16: Percentual de proliferação celular nos dispositivos no sétimo dia de cultura celular. .	46
Figura 17: Imagens de MEV no sétimo dia de cultura dos dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d); microfibras de fibroína completamente envolta por células (e). Setas vermelhas indicam microfibras de fibroína.	48
Figura 18: Reconstituição tridimensional do espalhamento das células nos dispositivos.	49
Figura 19: Teste de viabilidade celular para os dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d) no sétimo dia de cultura.	50
Figura 20: Fotografia do equipamento de QCM-D. Vista interna da câmara com sensor montado (a); Câmara aberta do QCM-D contendo água de lavagem (b); Parte externa do sensor, que fica em contato com as soluções poliméricas (c); Parte interna do sensor (d) e Parte externa do sensor após os experimentos de deposição (CHI/SF) ₅ (e).	59
Figura 21: Teste de compatibilidade entre a fibroína e CHI pH 6 e fibroína e PAH pH 3, pH 6 e pH 9.	64
Figura 22: Fotografias (a) e micrografias (b) dos filmes depositados em lâmina de silício nas condições de secagem extra (1) e processo úmido (sem secagem) (2).	66
Figura 23: Curvas de crescimento dos filmes <i>layer-by-layer</i> com fibroína.	68
Figura 24: Fotografias dos filmes CHI/SF _{LiBr} e PAH/SF _{LiBr} com 10 (a), 20 (b), 30 (c) e 40 (d) bicamadas.	69
Figura 25: Intumescimento dos filmes estudados com 20 bicamadas.	70
Figura 26: Curva típica obtida na análise de QCM-D para o filme CHI/SF _{LiBr}	71
Figura 27: Curva típica obtida na análise de QCMD após ser subtraída frequência e dissipação da água e serem mascaradas as etapas de secagem.	71
Figura 28: Espessura do filme úmido <i>versus</i> número de camadas depositadas obtidas por QCM-D para os diferentes filmes. As linhas conectando os pontos foram adicionadas à figura para maior clareza dos resultados. Números ímpares indicam a deposição do par catiônico (quitosana ou PAH) e números pares indicam a deposição de fibroína.	72
Figura 29: Imagens de microscopia óptica dos filmes (CHI/SF _{CaCl2}) com 10 (a), 20 (b), 30 (c) e 40 (d) bicamadas.	75
Figura 30: Imagens de microscopia óptica dos filmes (CHI/SF _{LiBr}) ₂₀ (1) e (PAH/SF _{LiBr}) ₂₀ (2), depositados em substrato de silício (a), ZnSe (hidrofóbico) (b) e vidro (c).	76

Figura 31: Microscopia de força atômica da superfície dos filmes no modo contato intermitente (CHI/SF _{LiBr}) ₂₀ (a,b) e (PAH/SF _{LiBr}) ₂₀ (c).	77
Figura 32: Filmes (SF/SF) ₂₀ depositados em silício: imagem de microscopia óptica (a) e imagem de microscopia de força atômica no modo contato intermitente (b).....	78
Figura 33: Imagem de AFM mostrando fibrilas de fibroína de seda obtidas por <i>spin-coating</i> por Greving <i>et al.</i> (2012).....	79
Figura 34: Energia total de interação entre duas partículas, conforme teoria DLVO. Adaptado de Israelachvili (1992).	80
Figura 35: Espectro de FTIR dos filmes (PAH/SF) ₂₀ e (CHI/SF) ₂₀ depositados em substrato de ZnSe.	83
Figura 36: Espectro de dicroísmo circular dos filmes (PAH/SF) ₂₀ e (CHI/SF) ₂₀ depositados em lâminas de quartzo (a) e da solução de fibroína 0,15 g/L (b).	85
Figura 37: Curvas típicas de força-distância obtidas por nanoindentação em AFM dos filmes estudados.	86
Figura 38: Teste de viabilidade celular para os filmes (CHI/SF) e (PAH/SF).....	88
Figura 39: Imagens de microscopia de fluorescência da adesão e proliferação de células de mioblastos C2C12 incubadas no controle de vidro (a) e nos filmes <i>layer-by-layer</i> (CHI/SF) _{20,5} (b), (CHI/SF) ₂₀ (c), (PAH/SF) _{20,5} (d) e (PAH/SF) ₂₀ (e), no segundo (1), quarto (2) e sétimo (3) dia de cultura.	89
Figura 40: Imagem de microscopia de fluorescência do início do descolamento das células dos filmes.	90
Figura 41: Imagens de microscopia de fluorescência da adesão e proliferação de células de mioblastos C2C12 incubadas no controle de vidro (a) e nos filmes <i>layer-by-layer</i> contendo fibronectina (CHI/SF) _{20,5} (b), (CHI/SF) ₂₀ (c), (PAH/SF) _{20,5} (d) e (PAH/SF) ₂₀ (e), no segundo (1), quarto (2) e sétimo (3) dia de cultura.	91
Figura 42: Fotografia do tubo de colágeno contendo células logo após preparo (a) e após 1 dia de cultura em formato cilíndrico (b).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura dos diferentes hidrogéis analisados neste estudo.....	26
Tabela 2: Resultados do teste de tração em hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína.	38
Tabela 3: Espessura dos filmes secos (CHI/SF _{LiBr}) ₃₀ depositados por 10 minutos em substrato de vidro ou silício, antes e após tratamento por 20 minutos em etanol 70%.	67
Tabela 4: Medidas de ângulo de contato dos filmes <i>layer-by-layer</i> com fibroína depositados em lâminas de silício e de vidro.	74
Tabela 5: Principais bandas observadas na análise de FTIR nos filmes (PAH/SF) ₂₀ e (CHI/SF) ₂₀ depositados em cristal de ZnSe.....	84

ABREVIACÕES

AFM – Microscopia de força atômica

BC - Bicamadas

CHI – Quitosana

COL – Colágeno

DMEM - Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DRX – Difração de raios X

ECM – Matriz extracelular

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EtOH – Etanol

FDA – Food and Drug Administration

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

LbL – *Layer-by-layer*

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NaOH – Hidróxido de sódio

PAA – Ácido poli(acrílico)

PAH – Hidrocloro de poli(alilamina)

PBS - Tampão fosfato

PDAC – Poli(cloreto de dialildimetil amônio)

pH – Negativo do logaritmo da concentração de H^+

pK – Negativo do logaritmo da constante de ionização

PSMCs – Células musculares lisas extraídas da aorta de porcos

PSS – Ácido poli(4-estireno sulfônico)

SF – Fibroína de seda

SPS – Poli(4-estireno sulfonato de sódio)

UV - Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

A fibroína de seda é uma proteína fibrosa que apresenta excelentes propriedades mecânicas e térmicas e vem sendo bastante explorada para utilização na área de biomateriais. Uma das grandes vantagens da fibroína de seda é sua versatilidade, podendo ser explorada em sua forma natural, como uma fibra altamente cristalina e resistente, ou através da manipulação da solução de fibroína, formando-se diferentes materiais, como filmes, hidrogéis, esferas, entre outros (Altman *et al.*, 2003).

Nesta tese, buscou-se explorar métodos de preparo de materiais micro e nanoestruturados com fibroína de seda combinada a outros polímeros, tanto em sua forma natural (microfibras) como em solução, sendo possível formar nanofibrilas de fibroína de seda. O estudo de materiais estruturados com a fibroína foi realizado tanto bidimensional como tridimensionalmente, a fim de comprovar sua versatilidade em conjunto com diferentes polímeros e em diferentes formatos, visando aplicações na área biomédica.

Em um primeiro momento, a fibroína de seda foi estudada na forma de microfibras, com menor processamento no laboratório, de maneira a atuar como reforço mecânico em hidrogéis de colágeno, visando conjugar a resistência mecânica da fibroína com a excelente compatibilidade do colágeno, formando um possível substituto vascular.

Posteriormente, a fibroína foi explorada na formação de filmes nanométricos, bidimensionais, com múltiplas camadas, com quitosana e com hidrocloreto de poli(alilamina). Nesta etapa foi analisado todo o processo de preparo da solução de fibroína, sendo necessário elevado conhecimento a respeito da manipulação e processamento da solução, permitindo ao final do estudo obter um controle rigoroso da estrutura supramolecular da fibroína, através da formação de agregados coloidais e nanofibrilas, imobilizadas nos filmes nanométricos.

Esta tese está organizada da seguinte maneira: No Capítulo 3 é apresentada a revisão bibliográfica. No Capítulo 4 descreve-se o estudo da utilização da fibroína em materiais tridimensionais, como em hidrogéis de colágeno. Já no Capítulo 5 relata-se o estudo da fibroína em materiais bidimensionais, como é o caso dos filmes ultrafinos preparados pelo método *layer-by-layer*. No Capítulo 6 é feita a discussão final e no Capítulo 7 são apresentadas as conclusões.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi obter materiais micro e nanoestruturados com fibroína de seda para contato com células animais, visando ressaltar a versatilidade da fibroína no desenvolvimento de diversos tipos de materiais, de maneira a melhorar as propriedades mecânicas e biológicas dos materiais nos quais a fibroína é adicionada, com potencial aplicação médica.

Objetivos específicos:

- Preparar hidrogéis de colágeno contendo microfibras de fibroína de seda para aplicação em tecidos vasculares;
- Caracterizar mecânica e biologicamente hidrogéis de colágeno contendo fibroína de seda;
- Desenvolver filmes *layer-by-layer* de fibroína de seda com quitosana e fibroína de seda com hidrocloreto de poli(alilamina), com controle sobre a deposição de fibrilas nanométricas de fibroína;
- Avaliar as propriedades mecânicas e biológicas dos filmes ultrafinos contendo fibroína de seda;
- Investigar a aplicação da fibroína de seda na área médica e verificar o comportamento celular quando em contato com materiais bidimensionais (2D, *layer-by-layer*) e tridimensionais (3D, hidrogéis) contendo fibroína.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais e engenharia tecidual

O aumento da expectativa de vida torna necessário o desenvolvimento de materiais para uso médico, chamados biomateriais, de maneira a melhorar a qualidade de vida da população. O termo ‘biomaterial’ é bastante controverso e foi inicialmente definido em 1987 (Williams, 1987). Desde então algumas revisões foram propostas e a definição mais atual publicada por Williams (2009) é: ‘Um biomaterial é uma substância que foi projetada de forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, na medicina humana ou veterinária’.

Um biomaterial deve ser biocompatível (desempenhar resposta adequada à sua aplicação), ser bioestável, esterilizável, não ser tóxico, inflamatório ou carcinogênico e ter propriedades mecânicas adequadas à sua função (Ratner *et al.*, 2004). Para o desenvolvimento de um biomaterial devem ser aplicados conhecimentos multidisciplinares como engenharia e ciência dos materiais, biotecnologia, ciências médicas, entre outros.

Os biomateriais podem ser classificados como naturais (fibras protéicas, polissacarídeos etc.) ou sintéticos (metais, cerâmicas, polímeros etc.); como bioabsorvíveis ou temporários (alguns tipos de suturas, enxertos etc.) e bioestáveis ou permanentes (válvulas cardíacas, próteses de articulações, próteses ósseas metálicas etc.) (Ratner *et al.*, 2004).

Os biomateriais têm um papel importante na engenharia tecidual (também chamada engenharia de tecidos), que é a ciência que estuda ou desenvolve processos para sintetizar ou regenerar tecidos e órgãos. Na engenharia tecidual, as células são cultivadas *in vitro* e inoculadas em uma matriz sintética (*scaffold*), que é implantada no paciente. O objetivo da engenharia tecidual é o de promover o desenvolvimento de um tecido sadio, sendo que, à medida que o *scaffold* se degrada, o novo tecido vai sendo formado (Cheung *et al.*, 2007).

Um *scaffold* é, portanto, uma matriz tridimensional que serve como suporte para a proliferação celular e desenvolvimento de um novo tecido biológico. O *scaffold* deve ser capaz de atender as exigências mecânicas do tecido que será regenerado, dar suporte à adesão e proliferação celular, possuir taxa de degradação compatível com a taxa de formação do tecido biológico, sendo os produtos de sua degradação não tóxicos e não deve produzir reações tóxicas

ou inflamatórias (Liu, Xia e Czernuszka, 2007). A porosidade também é um fator que deve ser controlado. Valores típicos de porosidade em *scaffolds* são da ordem de 90% e os poros devem ser interconectados para permitir a migração celular e difusão de nutrientes (Freyman, Yannas e Gibson, 2001). O tamanho ideal de poros é diretamente influenciado pelo tamanho das células (que irá variar em função do fenótipo da célula) e, portanto, irá depender do tipo de célula utilizado e da aplicação desejada. Valores típicos de tamanhos de poros para *scaffolds* para regeneração óssea são da ordem de 100 μm (Freyman, Yannas e Gibson, 2001), enquanto para *scaffolds* para engenharia tecidual vascular os poros devem ser menores do que 40 μm (Narayan e Venkatraman, 2008; Mathews *et al.*, 2012). Também se deve considerar a rigidez do material utilizado no *scaffold*. Para o caso de polímeros, por exemplo, a estrutura do *scaffold* é mais maleável e as células são capazes de permear pelo *scaffold* mesmo com poros menores. Quando inoculado com células, o *scaffold* passa a ser chamado de *construct* ou dispositivo.

Os polímeros naturais são muito interessantes para aplicação como *scaffolds* em engenharia tecidual, tendo o seu estudo iniciado nas últimas décadas e crescido continuamente. A grande maioria dos polímeros naturais não são tóxicos, são biodegradados em resíduos não tóxicos, que podem ser assimilados pelo organismo ou excretados normalmente, são biocompatíveis com uma ampla variedade de células e tecidos, podem ser produzidos em diversas morfologias, formatos e tamanhos, conforme a necessidade da aplicação, possuem propriedades mecânicas adequadas para aplicações biomédicas tanto em tecidos duros como em tecidos moles e, em geral, são esterilizáveis. Além disso, a presença de grupos funcionais em suas moléculas permite modificações químicas e bioquímicas, principalmente na superfície, que possibilita sua funcionalização e expandem seu campo de aplicação (Abramson *et al.*, 2004).

Grande parte dos polímeros naturais oferece como principal vantagem o fato de serem similares às macromoléculas que o ambiente biológico está preparado para reconhecer e metabolizar. Esta similaridade possibilita projetar biomateriais que funcionam biologicamente a nível molecular e não somente a nível macroscópico (Abramson *et al.*, 2004). Alguns polímeros naturais também são capazes de formar hidrogéis, possuem estruturas organizadas, além de atuarem como ligantes para as células receptoras.

Dentre os polímeros naturais que vêm sendo muito estudados para aplicação como *scaffolds*, podemos citar algumas proteínas, como o colágeno (Boccafroschi *et al.*, 2005) e a

fibroína de seda (Zhou *et al.*, 2010), e também alguns polissacarídeos, como o ácido hialurônico (Ren *et al.*, 2009), a quitosana (Ko, Sfeir e Kumta, 2010) e o alginato (Bhattarai *et al.*, 2006).

3.2 Fibroína de seda

A seda é uma das fibras naturais mais abundantes na natureza e pode ser obtida a baixo custo (Mori e Tsukada, 2000). As sedas são biopolímeros protéicos, produzidos na forma de fibras por alguns artrópodes, como o bicho-da-seda, a aranha, o escorpião e a pulga. A seda mais estudada é a produzida pelo bicho-da-seda domesticado (*Bombyx mori*).

A fibroína de seda é uma proteína presente no casulo do bicho-da-seda. O casulo do bicho-da-seda, por sua vez, é composto pelas fibras de fibroína e pela sericina, uma espécie de cola responsável por unir as fibras de fibroína, formando a estrutura do casulo. A molécula de fibroína é composta por duas cadeias de polipeptídeos unidas por ligação dissulfídica. A cadeia leve apresenta massa molecular de aproximadamente 25 kDa e não apresenta regiões repetitivas. Já a cadeia com maior massa molecular (aproximadamente 390 kDa) é composta por uma sequência de aminoácidos (em média 16 tipos de aminoácidos), sendo os principais a glicina (45,9%), a alanina (30,3%) e a serina (12,1%) (Figura 1) (Sashina *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2009).

A fibroína apresenta dois tipos principais de estrutura secundária, chamados seda I e seda II. A estrutura seda I apresenta conformação estrutural do tipo enovelamento aleatório e α -hélice, é solúvel em água, metaestável e presente em soluções aquosas de fibroína. Já a estrutura seda II é caracterizada por apresentar conformação folha- β , é a forma hidrofóbica e termodinamicamente estável da fibroína, estabilizada por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, presente na fibra de fibroína (Hakimi *et al.*, 2007; Vepari e Kaplan, 2007). As estruturas seda I e seda II coexistem em materiais derivados de fibroína, sendo que a predominância de cada estrutura irá determinar as propriedades dos materiais. Por exemplo, materiais com predominância de estrutura seda II são insolúveis em água, são cristalinos e apresentam maior resistência térmica e mecânica e menor taxa de degradação do que materiais com predominância de estrutura seda I. Devido ao fato de a estrutura seda I ser metaestável, ela pode ser convertida à seda II por tratamentos físicos e químicos, tais como o uso de temperatura (Putthanarat *et al.*, 2002) e umidade elevadas (Hino, Tanimoto e Shimabayashi, 2003; Kawahara, Furukawa e Yamamoto, 2006), uso de solventes

orgânicos (metanol e etanol) (Chen *et al.*, 2001a; Nogueira *et al.* 2010a), cisalhamento (Jin e Kaplan, 2003; Nogueira *et al.*, 2009), entre outros.

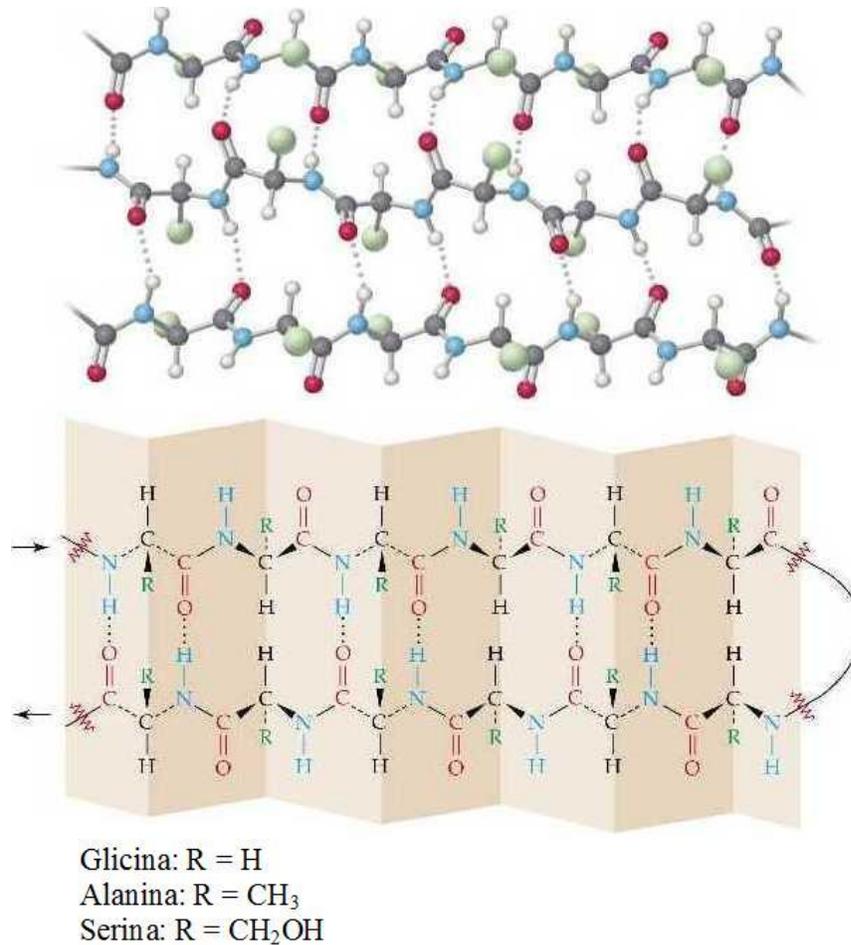


Figura 1: Estrutura química da fibroína de seda e representação esquemática da conformação folha- β . Adaptado de Silkwood silkTM (2011).

A fibroína é secretada na seção posterior da glândula do bicho-da-seda e estocada até atingir uma concentração de 30% (m/v) na seção intermediária da glândula, onde a sericina também é secretada. A fibroína e a sericina passam então para a seção anterior da glândula sem se misturar e são fiadas em ar para formar o casulo (Terry *et al.*, 2004). Também se sabe que uma combinação de forças de cisalhamento, desidratação, variação de pH e íons potássio e cobre estão envolvidos na síntese da fibra de seda, porém os mecanismos que transformam a seda solúvel em água em fibras insolúveis ainda não são completamente compreendidos (Hakimi *et al.*, 2007).

A fibroína é separada da sericina por um processo chamado de desgomagem, no qual os casulos do bicho-da-seda são imersos em soluções alcalinas ou em água fervente, que dissolve a sericina e mantém as fibras de fibroína estáveis. Durante o processo de desgomagem, cerca de 25% da massa dos casulos é removida devido à remoção da sericina, sendo também observadas mudanças nas propriedades mecânicas do material (Altman *et al.*, 2003).

As fibras de fibroína são biodegradáveis, termicamente estáveis (com degradação térmica iniciando em temperaturas acima de 150 °C), altamente cristalinas, com estrutura folha- β bem alinhada, flexíveis e resistentes à tração, além de serem insolúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos.

As fibras de fibroína podem ser dissolvidas em soluções concentradas de ácidos e em soluções aquosas e orgânicas de sais (Sashina *et al.*, 2006). A dissolução limitada das fibras de fibroína se deve à presença de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, à sua elevada cristalinidade e às suas propriedades físico-químicas (Chen *et al.*, 2001b). Atualmente, as soluções mais utilizadas para dissolver as fibras de fibroína são: 1) brometo de lítio e 2) uma mistura feita com cloreto de cálcio, etanol e água. Estas soluções contêm elevada concentração de sais e alta força iônica, quebrando as ligações de hidrogênio intermoleculares que estabilizam a estrutura folha- β das fibras de fibroína.

A solução salina de fibroína é supersaturada e pode ser estocada por vários meses sem que ocorra gelificação ou mudança conformacional da fibroína devido à elevada força iônica que promove a solvatação das fibras de fibroína. Porém, para produzir materiais com fibroína é necessário remover os sais da solução por diálise, a fim de se obter uma solução aquosa de fibroína. Durante a diálise, os íons do sal são removidos da solução de fibroína para a água de diálise por difusão e a força iônica da solução diminui. A solução de fibroína passa então para a região metaestável devido à ausência de íons disponíveis para promover a solvatação da fibroína, podendo sofrer uma transição sol-gel, formando estruturas folha- β auto-organizadas, resultando em uma rede de fibroína reticulada fisicamente. Qualquer perturbação na solução aquosa de fibroína, obtida após diálise (região metaestável), poderá resultar em separação de fase instantânea, com formação de um hidrogel de fibroína.

A fibroína é um polímero natural bastante versátil e pode ser processada de maneira a formar diferentes materiais, tais como filmes (Du *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010a), pós (Rajkhowa *et al.*, 2009), microesferas (Wang *et al.*, 2007; Srisuwan, Srihanam e Baimark, 2009),

nanofibras (Jeong *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2010), hidrogéis (Kim *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2011), entre outros. Também pode ser utilizada em sua forma natural, ou seja, na forma de fibras com diâmetro micrométrico, conhecidas por sua elevada resistência mecânica.

Em comparação com outros polímeros naturais, a fibroína possui propriedades muito interessantes para aplicações na área médica, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mínima reação inflamatória, permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água, possibilidade de esterilização, elevada resistência mecânica, térmica e microbiana (Um *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2003; Macintosh *et al.*, 2008). Alguns casos de hipersensibilidade à seda já foram relatados e atribuídos à sericina. Sabe-se que se a sericina for removida é possível obter materiais adequados para utilização como biomaterial (Altman *et al.*, 2003).

O uso de fibroína de seda como biomaterial foi recentemente aprovado pela agência regulatória americana FDA (*Food and Drug Administration*), sendo *scaffolds* feitos a partir de fibroína para regeneração de tecidos moles (tecido conectivo, tendões e ligamentos) comercializados pela empresa Serica Technologies Inc.

A fibroína é susceptível à degradação biológica quando exposta a enzimas proteolíticas, como colagenases e proteases (Monti *et al.*, 2005). Apresenta taxa de degradação lenta *in vitro* e *in vivo*, o que é uma excelente característica para aplicação em engenharia tecidual, pois o biomaterial deve ser capaz de manter sua integridade mecânica durante a formação do novo tecido (Horan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008a; Zhou *et al.*, 2010). A taxa de degradação de materiais derivados da fibroína está diretamente relacionada ao modo de processamento e conteúdo de conformação estável do tipo folha- β . Materiais com maior conteúdo de conformação do tipo folha- β apresentam degradação mais lenta (Rockwood *et al.*, 2011).

A esterilização térmica (autoclave) também é uma etapa fundamental no desenvolvimento de dispositivos médicos e normalmente representa uma limitação do uso de polímeros naturais na área médica, pois os mesmos geralmente apresentam baixa resistência térmica. Entretanto, estudos realizados por Weska (2009) revelaram que membranas de fibroína de seda podem ser esterilizadas em condições de temperatura, umidade e pressão elevadas, sem causar degradação ou modificações estruturais significativas nas mesmas.

A fibroína tem sido utilizada em aplicações biomédicas como sutura desde o final do século 19, provando ser um biomaterial eficiente para esse tipo de utilização (Macintosh *et al.*, 2008). A fibroína de seda possui aplicações em diversas áreas do campo biomédico, como pele

artificial e sistemas de liberação controlada (Ki, Park e Jin, 2009), substrato para imobilização enzimática, lentes de contato com alta permeabilidade ao oxigênio e biossensores para a detecção de doenças (Mori e Tsukada, 2000), cultura de células de tecidos ósseo, cartilaginoso e de ligamentos (Vepari e Kaplan, 2007; Macintosh *et al.*, 2008), entre outros.

3.2.1 Fibrilas de fibroína de seda

O bicho-da-seda é capaz de produzir fibras que exibem elevada resistência mecânica e elasticidade. Apesar dos recentes avanços na manipulação e processamento da fibroína de seda, os materiais produzidos com a solução de fibroína preparada em laboratório ainda não apresentam as mesmas propriedades que tornam a fibroína natural tão atraente. Os mecanismos envolvidos no processamento das proteínas da seda na forma de fibras ainda não são completamente entendidos, resultando em falhas ao se tentar reconstituir as notáveis propriedades das fibras de seda nativas *in vitro*, a partir de soluções de fibroína preparadas em laboratório. Para entender melhor a estrutura molecular e supramolecular da fibroína e o processamento hierárquico da auto-organização da fibroína em fibras durante o seu preparo pelo bicho-da-seda, alguns autores vem propondo estratégias de confecção das fibras, porém o entendimento do processo como um todo permanece um desafio (Gong *et al.*, 2009; Greving *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012).

A melhor hipótese até o momento indica que as moléculas de fibroína formam agregados coloidais em solução aquosa, pois agem como polímeros hidrofílicos-hidrofóbicos-hidrofílicos, formando então estruturas esféricas em água, com grandes blocos hidrofílicos em sua superfície, em contato com a água, e grandes blocos hidrofóbicos e pequenos blocos hidrofílicos no interior dos agregados. Estes agregados coloidais podem se unir formando nanofibrilas em função de parâmetros como a concentração da solução de fibroína e a carga eletrostática (Lu *et al.*, 2012). A Figura 2 mostra uma representação esquemática do mecanismo de auto-organização da fibroína, conforme proposto por Lu *et al.* (2012).

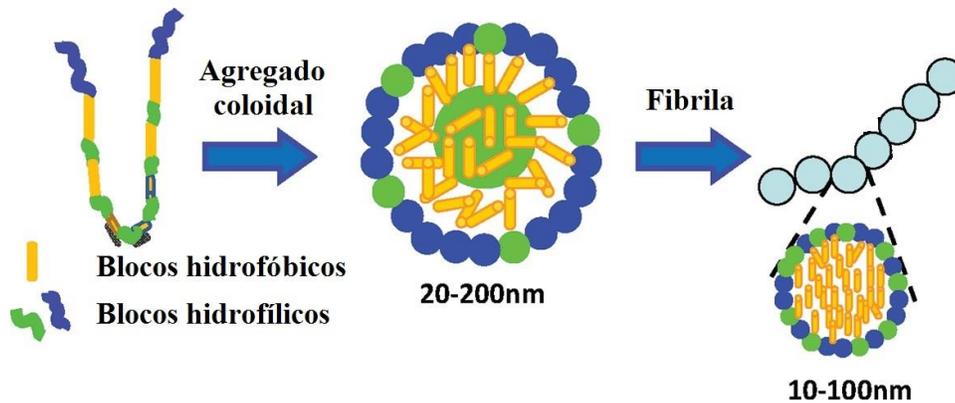


Figura 2: Modelo de auto-organização da fibroína formando agregados coloidais que se organizam formando fibrilas. Adaptado de Lu *et al.* (2012).

Por outro lado, outros autores propõem que as nanofibrilas de fibroína são formadas por cisalhamento (Greving *et al.*, 2012). Neste estudo, os autores utilizaram solução de fibroína extraída diretamente das glândulas do bicho-da-seda e observaram a formação de nanofibrilas, com diâmetro da ordem de 20-25 nm, durante o processo de *spin coating*. Os autores atribuíram a formação das nanofibrilas ao cisalhamento imposto pelo método, já que não foram observadas nanofibrilas de fibroína quando a mesma solução foi incubada no substrato, sem cisalhamento. Além disso, outro grupo de pesquisa verificou que o estímulo nanomecânico causado pela ponta do microscópio de força atômica no modo de contato induziu a nucleação e crescimento de nanofibras de fibroína modificada com elastina (Johnson *et al.*, 2012). Por fim, alguns autores propõem que a formação de nanofibrilas de fibroína é induzida pela formação de estrutura folha- β a partir do estiramento dos blocos hidrofóbicos presentes no interior dos agregados coloidais (Chen *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2009). Todas estas diferentes abordagens têm como ponto comum o fato de que a molécula de fibroína forma agregados coloidais quando presente em solução aquosa neutra diluída.

3.3 Colágeno

O colágeno é uma das proteínas mais abundante da natureza, encontrado nos tecidos biológicos de mamíferos, com a função de fornecer integridade mecânica aos mesmos (Gobeaux *et al.*, 2008). O colágeno representa aproximadamente 25% das proteínas presentes no corpo

humano, sendo o principal componente dos tecidos conectivo, ósseo, cartilaginoso, de ligamentos e tendões. Apresenta ótima resistência mecânica e elasticidade, sendo o responsável pela elasticidade da pele. O colágeno possui conformação do tipo tripla hélice, constituída pela repetição da trinca básica de aminoácidos (Glicina-X-Y)_n, onde X geralmente é uma prolina e Y uma hidroxiprolina (Figura 3a).

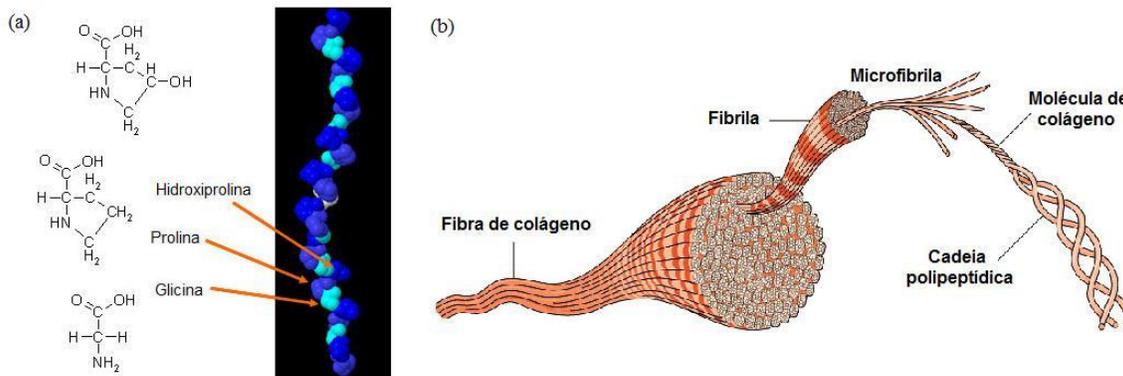


Figura 3: Estrutura química do colágeno, constituído pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina (a) e representação esquemática da constituição da fibra de colágeno (b). Adaptado de Berg (2011) e Harris e Gonsalves (2011).

Existem mais de 20 tipos diferentes de colágeno, presentes em diferentes tecidos biológicos. O colágeno do tipo I é a principal proteína presente no tecido vascular e vem sendo muito estudado para aplicações em engenharia tecidual vascular como potencial candidato no desenvolvimento de substitutos vasculares (vasos sanguíneos) (Couet, Rajan e Mantovani, 2007; Pang e Greisler, 2010).

As moléculas de colágeno do tipo I são capazes de se auto-organizar *in vitro* de maneira hierárquica, por um processo chamado fibrilogênese, formando microfibrilas, fibrilas, fibras e rede de fibras, conforme mostrado na Figura 3b (Lai, Li e Li, 2008; O'leary *et al.*, 2011). A estabilidade mecânica e química da rede de fibras de colágeno se deve às ligações de hidrogênio intra e intermoleculares das cadeias polipeptídicas (Kreger *et al.*, 2010).

O colágeno é utilizado principalmente na forma de géis. Sabe-se que fatores como o pH, a temperatura e a força iônica influenciam diretamente a transição sol-gel do colágeno, bem como as propriedades do gel resultante (Roeder *et al.*, 2002; Gobeaux *et al.*, 2008; Achilli e Mantovani, 2010).

O colágeno promove a adesão e crescimento celular e, por estar presente nos tecidos biológicos e ser componente da matriz extracelular, não apresenta resposta citotóxica (Boccafoschi *et al.*, 2005; Chajra *et al.*, 2008). Além disso, o colágeno é aprovado pelo FDA para diversos tipos de aplicações médicas. Entretanto, a grande limitação do uso do colágeno se deve à sua fonte de extração e segurança de aplicação. Por ser extraído de fonte animal, o colágeno pode transmitir patógenos e induzir reações imunes, mesmo após purificação (Cheung *et al.*, 2007).

O colágeno é biodegradado pela ação de enzimas, sendo que a taxa de degradação pode ser controlada em função do grau de reticulação. Menor grau de reticulação resulta em maior taxa de degradação, enquanto que maior reticulação resulta em degradação mais lenta. Além disso, um maior grau de reticulação resulta em géis com maior resistência mecânica devido ao aumento da densidade da rede de colágeno e compactação das fibrilas (Roeder *et al.*, 2002).

3.4 Quitosana

A quitosana é um produto da desacetilação da quitina, extraída da carapaça de crustáceos, como o camarão, o caranguejo e o siri, e também de insetos e parede celular de alguns fungos. A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes na natureza, depois da celulose.

A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear (Figura 4), cuja massa molecular pode variar de 50 a 1.000 kDa, dependendo do seu processo de obtenção. É um polissacarídeo biodegradável, biocompatível, hidrofílico e atóxico. Sua estrutura química é constituída pelos copolímeros β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, com grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário (Payne e Raghavan, 2007).

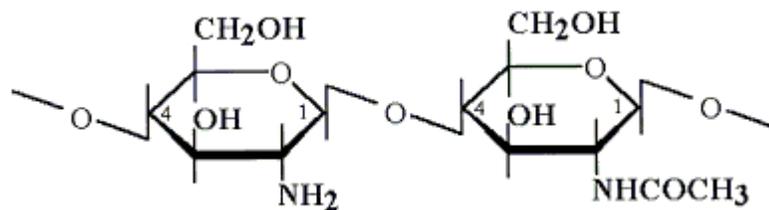


Figura 4: Estrutura química da quitosana. Fonte: Suh e Matthew (2000).

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos, como o ácido acético, ascórbico, fórmico, láctico, maleico e succínico (Romanazzi *et al.*, 2009), normalmente em pH abaixo de 6, devido à protonação dos grupamentos amino disponíveis em sua cadeia. Ela também é solúvel em alguns ácidos inorgânicos como o perclórico, o nítrico e o fosfórico (Kim *et al.*, 2008). Em baixos valores de pH, a quitosana é um polieletrólito carregado positivamente devido à protonação de suas amins primárias. À medida que o pH aumenta, as amins primárias são desprotonadas, levando à sua precipitação ou agregação (Payne e Raghavan, 2007).

A quitosana tem propriedades biológicas únicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade. Ela é inerte fisiologicamente, pode atuar como agente hemostático, antibacteriano, fungicida e antitumoral (Kim *et al.*, 2008). Também vem sendo utilizada no desenvolvimento de formulações terapêuticas, no tratamento de águas, produção de cosméticos, aditivos alimentícios e membranas semipermeáveis (Kurita, 2006; Vieira *et al.*, 2007; Cardenas *et al.*, 2008).

3.5 Hidrocloro de poli(alilamina)

O hidrocloro de poli(alilamina) (PAH) é um polímero sintético catiônico fraco, cuja estrutura química está representada na Figura 5. O PAH é solúvel em água e se apresenta positivamente carregado em solução aquosa (pH neutro) (Arai *et al.*, 2002).

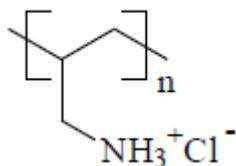


Figura 5: Estrutura química do hidrocloro de poli(alilamina).

Choi e Rubner (2005) determinaram que o PAH quando em solução aquosa apresenta pKa (pH no qual 50% dos grupos funcionais do polímero estão ionizados) entre 8,0 e 9,0. Em pH ácido (em torno de 3 a 4) os grupos amina do PAH encontram-se protonados na forma NH₃⁺. Com o aumento do pH, o PAH vai sendo desprotonado, apresentando maior quantidade de grupos NH₂.

O PAH é muito utilizado no estudo de filmes ultrafinos obtidos por *layer-by-layer* justamente por ser um polieletrólito fraco, permitindo a realização de estudos que visam regular as propriedades das camadas depositadas nos filmes *layer-by-layer* através de variações no pH e, conseqüentemente, na quantidade de cargas disponíveis para formar interações eletrostáticas com o poliânion (Choi e Rubner, 2005; Boudou *et al.*, 2009; Lichter e Rubner, 2009). Maiores informações a respeito da formação destes filmes *layer-by-layer* e dos parâmetros que influenciam diretamente sua construção serão discutidos a seguir, na seção 3.7.

O PAH não é tóxico e pode ser utilizado em diversas aplicações biomédicas, como na encapsulação de medicamentos para liberação controlada (Antipov *et al.*, 2001) e na confecção de recobrimentos antimicrobianos (Lichter e Rubner, 2009).

3.6 Hidrogéis

Hidrogéis são redes tridimensionais formadas por macromoléculas capazes de absorver grandes quantidades de água sem perder sua integridade estrutural. Os hidrogéis são amplamente utilizados em pesquisa biomédica devido à sua biocompatibilidade, capacidade de mimetizar tecidos biológicos e matriz extracelular (ECM), responder a estímulos externos, conter elevado teor de água e possuir boas propriedades de difusão de oxigênio, nutrientes e produtos residuais (Ratner *et al.*, 2004). Hidrogéis podem ser usados para a imobilização de enzimas ou células e medicamentos podem ser incorporados nos hidrogéis, agindo como dispositivos de liberação controlada (Wang *et al.*, 2008b; Guziewicz *et al.*, 2011). Hidrogéis também são estudados para usos como lentes de contato, tendões e peles artificiais, entre outros (Ratner *et al.*, 2004). Na engenharia tecidual os hidrogéis podem ser usados como *scaffolds* que dão suporte ao crescimento celular e degradam em taxa semelhante à taxa de formação do novo tecido. Além disso, as propriedades físicas, químicas e biológicas dos hidrogéis podem ser moduladas para atender requisitos mecânicos e funcionais do tecido hospedeiro (Xiao *et al.*, 2011).

A gelificação ocorre devido à reticulação das cadeias poliméricas, formando redes tridimensionais, por ação de agentes reticulantes (hidrogéis quimicamente reticulados) ou por estímulos físicos, tais como pH, temperatura, concentração de polímero, entre outros (hidrogéis fisicamente reticulados). Hidrogéis fisicamente reticulados representam o tipo mais promissor de hidrogéis para aplicações biomédicas, pois moléculas ativas, como proteínas ou até mesmo

células, podem ser aprisionadas no hidrogel, sem qualquer efeito tóxico sobre as mesmas. Por outro lado, para formação de hidrogéis químicos, normalmente são utilizados métodos como radiação UV, raios X ou raios γ para reticular o hidrogel, e os resíduos tóxicos resultantes destes métodos podem afetar a aplicação desses hidrogéis na área de biomateriais (Hu *et al.*, 2010). Ao utilizar reticulação química, dispositivos só podem ser preparados a partir do cultivo de células no topo do hidrogel, enquanto que em hidrogéis fisicamente reticulados, as células podem ser misturadas durante o preparo do hidrogel, ficando espalhadas e aprisionadas em toda a estrutura tridimensional.

3.6.1 Hidrogéis e *scaffolds* de colágeno e fibroína de seda

Existem poucos artigos na literatura que estudam o preparo de hidrogéis contendo fibroína de seda e colágeno para uso como *scaffolds* em engenharia tecidual. Basicamente são cinco artigos publicados pelo mesmo grupo de pesquisa da Tsinghua University, da China. Os estudos baseiam-se na adição de pequenas quantidades de gel de colágeno comercial (conteúdo máximo de 20% em massa) em solução aquosa de fibroína de seda, à temperatura de 50-60 °C. Desta maneira ocorre a dissolução do gel de colágeno na solução de fibroína, formando uma solução híbrida de fibroína/colágeno. Os *scaffolds* são então obtidos por congelamento e liofilização, além de imersão em metanol, para induzir a transição seda I para seda II da fibroína, formando uma estrutura mais cristalina e estável em água.

Os estudos iniciaram-se com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas de *scaffolds* de fibroína através da adição de colágeno (Lv *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2008). A adição de gel de colágeno aumenta a viscosidade da solução de fibroína e impede a formação prematura de estrutura lamelar de fibroína quando congelada e liofilizada para a obtenção do *scaffold*. Os autores atribuem este fato às interações entre a fibroína e o colágeno, obtendo-se assim um *scaffold* com estrutura mais regular, com poros interconectados, maior resistência à compressão e melhor biocompatibilidade, quando comparado com o *scaffold* de fibroína pura.

Em um estudo subsequente verificou-se que a maior interação entre as moléculas de fibroína e colágeno ocorre em pH = 7. Além disso, neste valor de pH, o *scaffold* obtido apresenta uma estrutura reticulada uniforme, o que reflete em maior resistência mecânica (Lu *et al.*, 2008). O uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como uma alternativa ao metanol

na transição seda I para seda II da fibroína também foi proposto para os *scaffolds* fibroína/colágeno (Lv *et al.*, 2008). Os resultados mostram melhorias nas propriedades mecânicas e térmicas dos *scaffolds* quando comparados com os tratados em metanol. Por fim, a compatibilidade destes *scaffolds* com fibroblastos e células musculares lisas foi investigada (Lu *et al.*, 2009). Verificou-se que a presença de colágeno no *scaffold* aumenta a adesão e proliferação celular, representando um material promissor para diversas aplicações em biomateriais.

3.7 Filmes ultrafinos obtidos pela técnica *layer-by-layer*

A técnica *layer-by-layer* (LbL) foi desenvolvida por Decher (1997) e consiste na deposição alternada de poli-íons de cargas opostas em substratos sólidos. Esta técnica vem sendo estudada nos últimos anos na produção de estruturas moleculares de multicomponentes e filmes ultrafinos com nano-arquiteturas específicas, de maneira simples, versátil e de baixo custo.

O processo básico é representado na Figura 6 e envolve a imersão de um substrato, carregado eletricamente, em uma solução diluída de um polieletrólito de carga oposta. A interação eletrostática entre o substrato e o polieletrólito promoverá a adsorção em excesso do polímero, invertendo a carga da superfície do substrato. O substrato, agora com carga positiva, é lavado para a retirada do excesso de polieletrólito e mergulhado em outra solução de polieletrólito, com carga oposta à da primeira solução. Assim, a carga inicial do substrato é reestabelecida, e tem-se a formação de um filme com duas camadas de polieletrólitos sobre o substrato, ou seja, tem-se a formação de uma bicamada. A repetição desta sequência de adsorções de polieletrólitos leva à formação de um filme com múltiplas camadas.

A maior parte dos filmes LbL tem sido produzida utilizando principalmente a atração eletrostática como força motriz para a adsorção e subsequente montagem das multicamadas. Porém, a deposição por LbL também pode ser baseada em outras interações, como ligações de hidrogênio (Stockton e Rubner, 1997; Clark e Hammond, 2000), ligações covalentes (Zhang *et al.*, 2003) e interações hidrofóbicas (Kotov, 1999).

Uma das maiores vantagens da técnica LbL é que, por ser feita a partir de soluções, permite a incorporação de uma grande variedade de materiais nas camadas individuais, bem como um controle rigoroso sobre a composição, propriedades e funcionalidade das multicamadas (Decher, 1997). A fabricação dos filmes está baseada em propriedades de superfície, sendo a

estrutura do filme definida em função da sequência de deposição e dos polímeros empregados. Ainda, as propriedades de cada camada dependem de uma série de parâmetros, tais como: concentração, força iônica e pH das soluções poliméricas, temperatura, tempo de deposição, tempo de lavagem, tipo de agitação, entre outros (Decher e Schlenoff, 2002). Dentre estes parâmetros podem-se citar o pH e a força iônica como os principais fatores que irão determinar a espessura, rugosidade e funcionalidade dos filmes LbL.

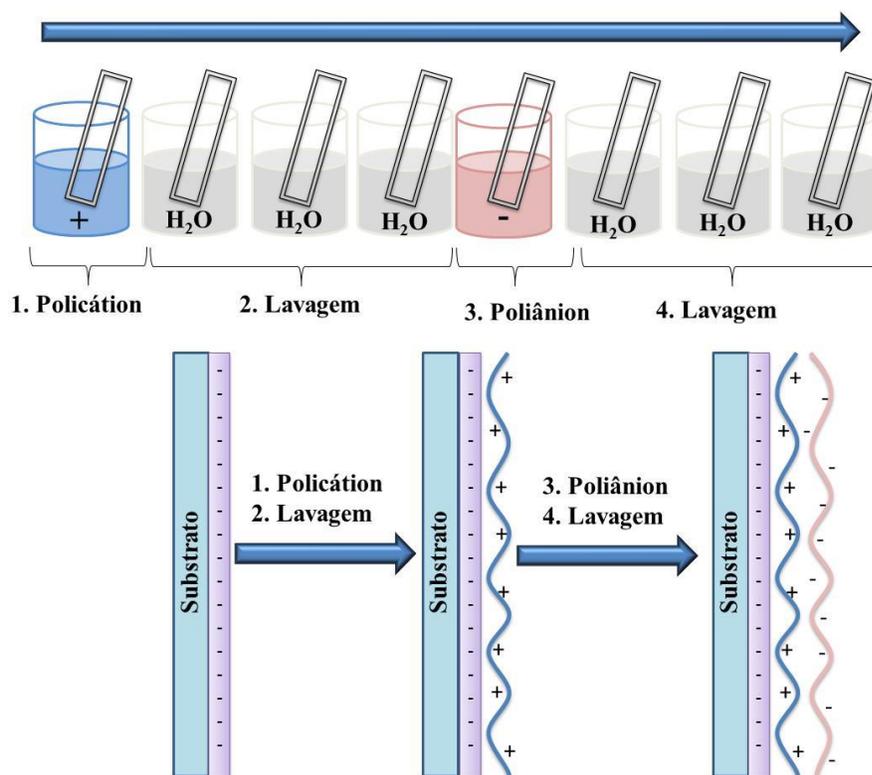


Figura 6: Representação esquemática da deposição de uma bicamada através da técnica de *layer-by-layer*.

Com relação ao pH das soluções poliméricas, deve-se considerar que o grau de ionização dos polieletrólitos irá variar de acordo com o pH do meio, dependendo da constante de ionização (pK) dos mesmos. Quando os polímeros estão altamente carregados, a forte repulsão entre os segmentos de sua cadeia fará com que sua conformação seja linear e esticada, acarretando na formação de filmes mais finos. Por outro lado, quando estes polímeros estão pouco carregados, a

baixa repulsão eletrostática resultará em uma conformação mais enovelada e irregular, resultando em filmes mais espessos (Elzbiaciak, Kolasinska e Warszynski, 2008).

A força iônica do meio também irá exercer importante função nas características finais dos filmes LbL. A presença de sal na solução polimérica, ou seja, o aumento da força iônica causa o enovelamento da cadeia polimérica. Isto ocorre porque a presença dos íons do sal causa uma espécie de ‘blindagem’ das cargas do polímero, diminuindo a repulsão eletrostática e permitindo o enovelamento do polímero. Com isso, o aumento da força iônica causa um aumento da espessura e rugosidade do filme, podendo também aumentar a quantidade de material adsorvido na superfície (Iruthayaraj *et al.*, 2005).

A maior parte das pesquisas sobre filmes LbL tem sido realizada com a utilização de polímeros sintéticos, tornando o uso de polímeros naturais para a formação de filmes multicamadas ainda mais interessante. Filmes finos multicamadas têm sido explorados para uso em diferentes tecnologias, tais como recobrimentos antiembaçantes (Cebeci *et al.*, 2006), antibacterianos (Lee, Cohen e Rubner, 2005), super hidrofílicos (Miyauchi e Tokudome, 2006), super hidrofóbicos (Ogawa *et al.*, 2007), na liberação de fármacos (Xavier, de Moraes e Ferreira, 2013), terapias celulares (Swiston *et al.*, 2008), adesão de células (Schneider *et al.*, 2007), entre outros.

3.7.1 Filmes produzidos pela técnica *layer-by-layer* contendo fibroína

Atualmente, o estudo de polímeros naturais para o preparo de filmes multicamadas está em fase inicial e poucos são os relatos existentes na literatura sobre o assunto. Esta área, portanto, apresenta grandes perspectivas na produção de novos materiais e aplicações. Existe um grande interesse no estudo de estruturas de polímeros naturais, tais como a fibroína, a quitosana, o alginato de sódio, o ácido hialurônico, a celulose, entre outros.

A solução de fibroína pode ser usada em processos de montagem em multicamadas nanométricas com um par catiônico, formando filmes ultrafinos com uma estrutura complexa de ligações intermoleculares, sendo as interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, as principais forças atuantes na deposição dos filmes.

A maioria dos estudos em filmes multicamadas produzidos por LbL com fibroína de seda é baseada em filmes somente com fibroína, sem um par catiônico. Wang *et al.* (2005) relataram a

deposição de fibroína por LbL pela primeira vez. Foi verificado um aumento na espessura do filme devido ao aumento da concentração de sais na solução de fibroína e pela diminuição do pH. Além disso, foi observada a necessidade de uma etapa de secagem após a deposição de cada camada de filme, responsável por estabilizar as ligações intra e intermoleculares da fibroína e permitir a deposição da próxima camada. O *spin coating* é um método que também pode ser utilizado para o preparo de filmes ultrafinos multicamadas com fibroína, apresentando excelentes propriedades mecânicas, como módulo elástico de 6,5 GPa e tensão de ruptura de 100 MPa (Jiang *et al.*, 2007).

O método LbL também pode ser usado no preparo de microcápsulas de fibroína com espessura e permeabilidade controladas para uso em sistemas de liberação controlada (Shchepelina *et al.*, 2011). Ainda, microreservatórios de fibroína em diversos formatos podem ser preparados com o uso de polímeros sintéticos no LbL, como o ácido poli(metacrílico), poli(N-vinilcaprolactama) e ácido tânico, principalmente devido à ação de interações por ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas (Kozlovskaya *et al.*, 2012).

Especificamente falando sobre filmes LbL de fibroína e quitosana, podemos citar apenas dois artigos publicados na literatura. Cai *et al.* (2007) utilizaram filmes multicamadas nanométricos de fibroína e quitosana para recobrir a superfície de filmes de titânio, de maneira a aumentar sua biocompatibilidade visando uma osteointegração mais eficiente. Testes *in vitro* utilizando osteoblastos sobre estas superfícies mostraram que o recobrimento LbL de fibroína e quitosana aumentou a proliferação e viabilidade celular.

Posteriormente, uma pesquisa realizada por nosso grupo em colaboração com o Massachusetts Institute of Technology (MIT) possibilitou um estudo mais detalhado a respeito de filmes multicamadas de fibroína e quitosana (Nogueira *et al.*, 2010b). Foi possível obter filmes multicamadas de espessura nanométrica, contendo fibrilas de fibroína alinhadas em determinadas direções. Os resultados demonstram que a solução utilizada para dissolver a fibroína, a presença de quitosana em pH 6, além da secagem entre as etapas de deposição dos filmes são fundamentais para a auto-organização da fibroína na forma de fibrilas. Além disso, foi possível obter um alinhamento das fibrilas de fibroína na direção de imersão do substrato nas soluções de biopolímeros. Para obter os filmes com fibrilas de fibroína alinhadas bidirecionalmente, o substrato era girado em 90°. Estes filmes anisotrópicos podem combinar resistência mecânica e biocompatibilidade. Enquanto diversos estudos focam na obtenção de superfícies com padrões

específicos para adesão celular através de técnicas como a fotolitografia, os filmes multicamadas de fibroína e quitosana possuem naturalmente fibrilas alinhadas e auto-organizadas, obtendo-se padrões naturais que têm o potencial de orientar a adesão e proliferação celular.

3.8 Histórico de colaboração entre os grupos de pesquisa

O Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP), da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, coordenado pela Profa. Marisa Beppu tem como principal linha de pesquisa o estudo de polímeros naturais para o preparo de materiais avançados, micro ou nanoestruturados, que possam ser utilizados em contato com células, para a fabricação de biomateriais e aplicações na área de biotecnologia. Especificamente para o caso da fibroína, o Lequip foi pioneiro no estudo desta proteína fibrosa no Brasil, com estudos iniciados em 2004.

Desde então, condições de manipulação e processamento da fibroína têm sido estudadas para o preparo de diversos materiais, tais como membranas densas (Nogueira *et al.*, 2010a) e porosas (Nogueira *et al.*, 2009). A partir deste estudo, foi desenvolvida e patenteada uma nova técnica de produção de membrana porosa de fibroína (Beppu, Polakiewicz e Nogueira, 2006), através de um processo rápido e simples de produção. Posteriormente, as membranas densas e porosas de fibroína foram estudadas por Weska (2009) quanto à possibilidade de esterilização e calcificação *in vitro*. Este estudo demonstrou que a fibroína de seda, contrariamente à maioria dos polímeros naturais, é capaz de resistir termicamente aos processos de esterilização normalmente empregados, além de estimular o depósito de fosfatos de cálcio, o que é interessante para aplicação em regeneração óssea. Posteriormente, Nogueira (2009) estudou a metaestabilidade da solução dialisada de fibroína (Nogueira *et al.*, 2011), além da obtenção de membranas pela técnica LbL utilizando soluções de fibroína e quitosana (Nogueira *et al.*, 2010b), e do potencial da fibroína como agente anticalcificante, no recobrimento de pericárdio bovino utilizado para a confecção de válvulas cardíacas (Nogueira *et al.*, 2010c). A fibroína também foi estudada quando combinada com alginato de sódio, tanto na forma de fibras quanto em solução (Moraes, 2010), apresentando excelentes resultados de melhoria de propriedade mecânica, além da obtenção de membranas com separação de fase em estruturas globulares, que podem apresentar excelente potencial na incorporação de fármacos ou compostos ativos.

A área de biomateriais e engenharia tecidual é interdisciplinar. Desta maneira, a colaboração com grupos de pesquisa de diferentes áreas como medicina, engenharia de materiais, biologia, entre outras, é fundamental para o sucesso da pesquisa. Para o desenvolvimento desta tese foram feitas colaborações com dois grupos de pesquisa, da Université Laval (Quebec, Canadá), onde foram realizados os estudos de incorporação de fibroína em hidrogéis de colágeno, em 3D, e do Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, USA), onde foram realizados estudos de filmes ultrafinos, em 2D, com auto-organização da fibroína na forma de fibrilas. A seguir será feito um breve resumo da colaboração já existente com os dois grupos e projetos realizados em colaboração que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

O *Laboratoire de Biomatériaux et Bioingénierie* (LBB) da Université Laval está localizado no *Centre de Recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise*, é coordenado pelo Prof. Diego Mantovani e tem como foco de suas pesquisas o desenvolvimento de materiais para a engenharia tecidual vascular. As pesquisas estão focadas no uso de colágeno como matriz para o desenvolvimento de uma artéria artificial. Diversas teses já foram desenvolvidas neste sentido, visando sempre a obtenção de um *scaffold* de colágeno em forma cilíndrica em que células possam ser inoculadas ou misturadas e que possa ser montado em um biorreator no qual as células irão proliferar e formar uma artéria tridimensional similar à humana. O método de extração do colágeno do tendão da cauda de ratos foi desenvolvido no próprio LBB (Habermehl *et al.*, 2005; Rajan *et al.*, 2006) e é capaz de manter a excelente citocompatibilidade do colágeno (Boccafoschi *et al.*, 2005), apresentando ótimas propriedades quando inoculado com células musculares lisas (Amadori *et al.*, 2007). Também foi desenvolvido um biorreator que permite a cultura celular em *scaffolds* tridimensionais, sendo possível reproduzir o ambiente fisiológico (Bilodeau *et al.*, 2005; Bilodeau e Mantovani, 2006; Couet e Mantovani, 2008b; Couet e Mantovani, 2010).

Além disso, foi desenvolvido um dispositivo de colágeno em geometria cilíndrica através da gelificação da solução de colágeno contendo células em moldes específicos, cultivados durante sete dias. Porém, a resistência mecânica deste material, mesmo após o cultivo celular, continuou sendo insatisfatória para ser manipulado e montado no biorreator (Boccafoschi *et al.*, 2007). O uso de radiação UV como método para aumentar a reticulação dos hidrogéis de colágeno e, conseqüentemente, melhorar sua resistência mecânica também foi estudado (Achilli *et al.*, 2008; Rajan *et al.*, 2008; Achilli, Lagueux e Mantovani, 2010). A influência de parâmetros como o pH,

a temperatura e a força iônica na gelificação do colágeno foi analisada como uma alternativa à radiação UV para a obtenção de hidrogéis de colágeno com melhores propriedades mecânicas (Achilli e Mantovani, 2010). Diversos protocolos de preparo do hidrogel de colágeno foram desenvolvidos e hidrogéis de colágeno mais resistentes foram obtidos a pH 10, 4 °C e 174 mM de força iônica, porém estas condições de gelificação não são ideais para o cultivo de células, inviabilizando o preparo de dispositivos com células misturadas ao hidrogel de colágeno. Também foi desenvolvido um modelo computacional baseado na teoria de compósitos com o objetivo de prever as propriedades mecânicas de *scaffolds* cilíndricos de colágeno e fibroína de seda (Couet *et al.*, 2007; Couet e Mantovani, 2008a). A propriedade mecânica avaliada foi a de complacência (*compliance*), propriedade apresentada pelos vasos sanguíneos, que devem suportar o bombeamento de sangue na direção radial. Em outras palavras, o teste de complacência mede a variação do diâmetro, ou seja, a deformação, de um cilindro de colágeno em função da pressão presente no interior do cilindro, até o seu rompimento. Porém, este estudo foi bastante inicial e não foram desenvolvidos experimentalmente *scaffolds* de colágeno e fibroína, nem mesmo avaliada sua compatibilidade e propriedades mecânicas ou biológicas.

Portanto, nesta tese, buscou-se combinar o conhecimento do grupo da UNICAMP no preparo e modificação de polímeros naturais (principalmente fibroína de seda) em suas diversas formas, com o conhecimento do grupo da ULaval em substitutos vasculares obtidos a partir do colágeno e testes biológicos, obtendo-se assim um hidrogel de colágeno microestruturado com fibroína de seda, que possa ser utilizado em engenharia tecidual vascular. A partir deste estudo pôde-se confirmar o potencial de aplicação da fibroína de seda como reforço mecânico em materiais tridimensionais, bem como sua compatibilidade celular.

Já o grupo do Massachusetts Institute of Technology (MIT), liderado pelo Prof. Michael Rubner é um dos pioneiros do estudo da técnica *layer-by-layer* no mundo, tendo os estudos iniciados no final da década de 90. A técnica LbL permite o preparo de filmes nanométricos avançados, com estruturas organizadas em camadas, que podem ser moduladas de acordo com a necessidade. A Profa. Marisa Beppu iniciou colaboração com o Prof. Michael Rubner no ano de 2006 quando introduziu o conceito do uso de biopolímeros nos sistemas LbL. Desde então foram realizados dois doutorados sanduíches de alunos da Profa. Marisa Beppu no MIT, sempre visando o uso de polímeros naturais na fabricação de filmes finos multicamadas. Nogueira *et al.* (2010b)

produziram filmes LbL de fibroína e quitosana com alinhamento de fibrilas e Vasconcelos *et al.* (2010) estudaram filmes LbL de quitosana e ácido hialurônico, capazes de aderir linfócitos B.

Nogueira *et al.* (2010b) realizaram um trabalho no qual foram produzidos filmes multicamadas de fibroína e quitosana com alinhamento de fibrilas de fibroína. Porém, o estudo do comportamento celular quando em contato com estes filmes não foi realizado, bem como as condições necessárias e o processo de formação das fibrilas não foi elucidado. Nesta tese, foi possível aperfeiçoar as condições necessárias para a formação das fibrilas alinhadas de fibroína, e obter o controle da deposição das fibrilas em um filme ultrafino, bidimensional.

4 HIDROGÉIS DE COLÁGENO REFORÇADOS COM FIBROÍNA DE SEDA

Neste capítulo descreve-se a obtenção de hidrogéis de colágeno reforçados com microfibras de fibroína de seda, visando aplicação na área de engenharia tecidual vascular.

O colágeno é responsável por promover integridade estrutural e dar suporte mecânico aos tecidos e órgãos. Durante a extração e dissolução do colágeno, sua organização hierárquica altamente estável é perdida devido à quebra das ligações de hidrogênio intermoleculares. Desta maneira, materiais obtidos a partir de soluções de colágeno apresentam propriedades mecânicas inferiores às observadas em suas fontes naturais, mas as propriedades biológicas do colágeno são preservadas (Boccafoschi *et al.*, 2005; Achilli, Lagueux e Mantovani, 2010).

Estudos que visam melhorar as propriedades mecânicas de hidrogéis de colágeno sugerem o uso de agentes de reticulação (Sundararaghavan *et al.*, 2008), de radiação UV (Achilli, Lagueux e Mantovani, 2010), e também da adição de outros materiais no colágeno, como a fibrina (Cummings *et al.*, 2004) e o sulfato de condroitina (Stuart e Panitch, 2008). Estes métodos, apesar de melhorarem a resistência mecânica do hidrogel, podem ser tóxicos às células e reduzir a biocompatibilidade do colágeno.

Neste contexto, a adição de outra macromolécula de origem natural, que possua boa compatibilidade celular e adequada resistência mecânica, como é o caso da fibroína, surge como uma alternativa aos métodos já propostos na literatura para melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis de colágeno, sem alterar seu desempenho biológico. A obtenção de hidrogéis de colágeno microestruturados com fibroína de seda ainda não foi estudada na literatura, sendo que neste capítulo objetiva-se conjugar as excelentes propriedades biológicas do colágeno com a elevada resistência mecânica da fibroína, de maneira a obter um material que possa ser utilizado como *scaffold* em engenharia tecidual vascular.

Na primeira parte do trabalho foi estudado o método de incorporação das microfibras de fibroína, preparo dos hidrogéis de colágeno e verificação da resistência mecânica destes hidrogéis. Já na segunda parte foi avaliada a interação dos hidrogéis reforçados com fibroína com células musculares lisas, muito utilizadas em estudos de engenharia tecidual vascular, pois estas células são constituintes da túnica média, presente nas artérias.

Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com o grupo coordenado pelo Prof. Diego Mantovani (Université Laval, Quebec, Canadá), durante realização de doutorado-sanduíche, no período de fevereiro a julho de 2011.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Matérias-primas

Foram utilizados casulos do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori*, fornecidos pela Fiação de seda Bratac (Bastos, SP), indústria brasileira e terceira maior produtora mundial de seda.

Colágeno do Tipo I foi extraído de tendões de cauda de ratos, seguindo o protocolo descrito por Rajan *et al.* (2006), desenvolvido no Laboratório de Biomateriais e de Bioengenharia, da Université Laval (Quebec, QC, Canadá).

4.1.2 Preparo das microfibras de fibroína de seda

Inicialmente foi necessário fazer a remoção da sericina dos casulos do bicho-da-seda. Cada 50 g de casulos foram lavados em 600 mL de solução aquosa de Na₂CO₃ 1 g/L, durante 30 min, em banho termostático, à temperatura de 85 °C. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, as fibras de fibroína obtidas foram lavadas com água destilada em abundância. As fibras foram secas à temperatura ambiente por 24 a 48 h (Li *et al.*, 2002). As fibras secas e livres de sericina foram moídas em moinho de facas com rotor tipo ciclone (TE-651/2, Tecnal) até fração passante na peneira mesh nº 10 (partícula com 2 mm de diâmetro), obtendo-se assim as microfibras de fibroína.

4.1.3 Preparo da solução de colágeno

Para o preparo da solução de colágeno a partir do tendão de cauda de ratos foi utilizado o protocolo estabelecido por Rajan *et al.* (2006). Inicialmente foi feito o isolamento das fibras de colágeno a partir de tendões de cauda de ratos. As fibras de colágeno foram parcialmente dissolvidas em solução de ácido acético 0,02 mol/L por 48 h e misturadas em um triturador de pás, congeladas e liofilizadas, resultando em uma esponja de colágeno que foi estocada congelada até o preparo da solução de colágeno.

Para obtenção da solução de colágeno 4 g/L, a esponja de colágeno foi misturada com ácido acético 0,02 mol/L. A solução foi então centrifugada para a remoção de impurezas e

desgaseificada. Ao final foi utilizada uma técnica de esterilização na qual 500 mL de solução de colágeno foram inseridos em membranas de diálise (Spectra/Por 1, MWCO: 6.000–8.000) que foram imersas em 4 L de ácido acético 0,02 mol/L por 1 hora. Em seguida, as membranas foram imersas em solução de clorofórmio 1% em água (solução na qual ocorre realmente a esterilização) por 1 hora. Logo após, as membranas foram inseridas em solução estéril de ácido acético 0,02 mol/L durante 8 dias, à 4 °C, sendo que a solução de ácido acético foi trocada a cada dois dias. Ao final do processo de diálise foi obtida solução de colágeno 4 g/L estéril, mantida refrigerada à 8 °C.

4.1.4 Preparo dos hidrogéis de colágeno com microfibras de fibroína

Para o preparo dos hidrogéis de colágeno foi utilizado protocolo já estabelecido no Laboratório de Biomateriais e de Bioengenharia (Université Laval), no qual 1,5% (vol) de solução de NaOH 1 mol/L, 3% (vol) de solução de NaCl 4 mol/L, 2% (vol) de solução de HEPES 1 mol/L, 43,5% (vol) de água ultrapura e 50% (vol) de solução de colágeno 4 g/L foram misturados em banho de gelo, utilizado para desacelerar a gelificação do colágeno. A concentração final de colágeno nas amostras foi de 2 g/L (0,2%). O pH final da solução gelificadora foi 7 e a gelificação ocorreu em bancada, à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), em cerca de 15 minutos.

Durante os 15 minutos precedentes à gelificação, as microfibras de fibroína foram adicionadas à solução gelificadora e homogeneizadas com o uso de bastão de poliestireno. Foram estudadas 3 quantidades de fibroína: 25, 50 e 75% em massa de microfibras de fibroína, em relação à massa seca de colágeno presente nos hidrogéis. A Tabela 1 apresenta a nomenclatura que será utilizada para cada um dos diferentes hidrogéis.

Tabela 1: Nomenclatura dos diferentes hidrogéis analisados neste estudo.

	Definição
COL	Hidrogel de colágeno puro (sem microfibras)
COL/SF25	Hidrogel de colágeno contendo 25% (massa) de microfibras de fibroína
COL/SF50	Hidrogel de colágeno contendo 50% (massa) de microfibras de fibroína
COL/SF75	Hidrogel de colágeno contendo 75% (massa) de microfibras de fibroína

Após a adição das microfibras de fibroína na solução gelificadora de colágeno, a mistura foi vertida em placas de Petri de poliestireno e mantida em condições ambiente até a gelificação. Após a formação do hidrogel, foram adicionados 2 mL de solução de tampão fosfato 1x (PBS) sobre o mesmo, que foi mantido durante toda a noite em estufa incubadora à 37 °C e 5% de CO₂, a fim de simular as condições de cultura celular. Com exceção dos testes biológicos, que serão descritos a seguir, todos os testes de caracterização dos hidrogéis foram realizados após o preparo dos hidrogéis nas condições descritas acima, de maneira a obter o mesmo histórico de preparo e condições térmicas.

4.1.5 Caracterizações

Todos os testes de preparo, caracterização morfológica e biológica dos hidrogéis de colágeno e fibroína foram realizados no Laboratório de Biomateriais e de Bioengenharia da Université Laval (Quebec, Canadá). A determinação do diâmetro e comprimento das microfibras de fibroína foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP. Já o teste de compressão confinada foi realizado no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPBio) (FEQ/UNICAMP) e o teste reológico no Laboratório de Colóides e Superfícies (IQ/UNICAMP). Todos os testes biológicos foram realizados sob o auxílio e supervisão da bióloga Estelle Marie-Pierre Paternotte.

4.1.5.1 Caracterização morfológica

O diâmetro e comprimento das microfibras de fibroína foram determinados a partir de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo as microfibras medidas com o auxílio do software UTHSCSA Image Tool. Foram utilizadas 5 diferentes imagens de MEV e foram medidas no mínimo 10 fibras diferentes de cada imagem.

A distribuição tridimensional das microfibras de fibroína nos hidrogéis de colágeno foi verificada através de imagens de microscopia de fluorescência (Axiophot Zeiss, Alemanha) na região de luz visível.

A morfologia dos hidrogéis foi verificada por microscopia eletrônica de varredura, uma técnica que consiste na varredura da superfície da amostra através de um feixe de elétrons e

permite verificar a superfície das amostras. Foi utilizado microscópio Jeol JSM-35CF (Japão), sendo as amostras fixadas pelo método de Karnovsky a fim de manter a estrutura tridimensional dos hidrogéis, sem perder informações referentes aos poros, formação de rede de fibrilas de colágeno, etc. Para isto, os hidrogéis foram lavados com tampão cacodilato 1 mol/L (Sigma-Aldrich) e fixados com solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich) em tampão cacodilato 0,1 mol/L) à 4 °C por 2 horas. Após fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão cacodilato 0,1 mol/L e foi adicionada solução pós-fixadora de tetraóxido de ósmio 0,5% (Sigma-Aldrich) em tampão cacodilato 0,1 mol/L, por 30 minutos. As amostras foram lavadas novamente com tampão cacodilato 0,1 mol/L e desidratadas com três concentrações diferentes de etanol (70, 95, 100%). Finalmente, as amostras foram secas utilizando um secador de ponto crítico (Polaron CPD 7501, Reino Unido), recobertas com ouro-paládio (Polaron SC500, Reino Unido) e observadas no MEV.

4.1.5.2 Caracterização mecânica

4.1.5.2.1 Resistência à tração

A resistência à tração dos hidrogéis foi verificada através de teste de tração realizado de acordo com as normas da ISO 7198 (1998) “Cardiovascular implants – Tubular vascular prostheses”. Foi utilizada uma máquina universal de ensaios Instron 5848 Microtester (Instron Corporation, USA), acoplada a uma célula de carga de 10 N. O teste de resistência à tração dos hidrogéis foi realizado com as amostras no formato de anel, conforme Figura 7, já que a fragilidade inerente dos hidrogéis e a dificuldade de acoplamento às garras impedem o uso de teste convencional de tração. Este teste adaptado, chamado de teste do anel, vem sendo bastante aplicado em amostras de hidrogéis de colágeno (Seliktar *et al.*, 2000; Pryse *et al.*, 2003). As amostras em formato de anel foram preparadas em moldes específicos (Figura 7a). Após serem colocadas nos suportes para o teste, as amostras acabam se alongando devido à elasticidade do colágeno, apresentando o formato observado na Figura 7b e 7c. Foi utilizada uma distância entre os suportes de 22 mm (comprimento da amostra) e 4 mm x 4,5 mm de área transversal. Foi empregada uma pré-carga de 20 mN e o teste foi realizado a uma taxa de deformação de 5 %/s (ou 1,1 mm/s), equivalente à deformação sofrida nos vasos sanguíneos devido ao fluxo sanguíneo. Foram colocadas duas marcas pretas nas amostras, conforme Figura 7b, e a deformação sofrida entre estas marcas foi seguida por câmera de vídeo acoplada ao equipamento.

O módulo de tensão foi definido como a regressão linear entre 2 e 10 % de deformação. Foram feitas 5 repetições de cada tipo de amostra.

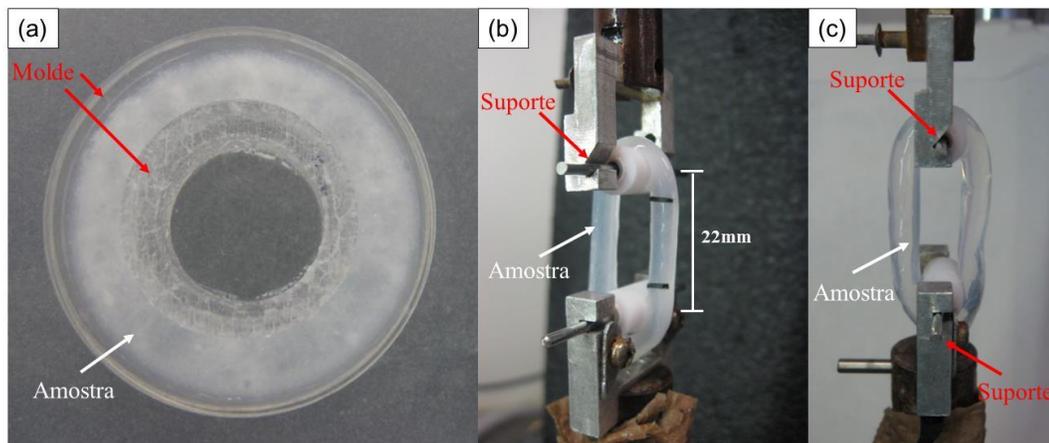


Figura 7: Vista superior do molde utilizado para preparo das amostras (a), vista lateral (b) e frontal (c) do aparato para realização do teste de tração em anéis.

4.1.5.2.2 Resistência à compressão

A resistência à compressão dos hidrogéis foi realizada de maneira confinada nas amostras em formato cilíndrico, com 22,2 mm de diâmetro e 5 mm de altura. O teste foi realizado à temperatura ambiente, em um analisador de textura TA.XT2 (Stable Microsystems SMD), com célula de carga de 10 N. O pistão utilizado para comprimir as amostras possuía 12,7 mm de diâmetro. Foi utilizada taxa de compressão de 0,2 mm/s. O módulo de compressão foi definido como a regressão linear entre 0 e 25% de compressão.

Foi utilizado teste de Tukey-Kramer com o auxílio do Software StatView 5.0 para analisar os resultados do teste de tração e compressão dos hidrogéis. As diferenças entre as amostras foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

4.1.5.2.3 Teste reológico

O teste reológico foi realizado para determinar os módulos elástico e viscoso dos hidrogéis, de maneira a verificar as propriedades da microestrutura do material. As amostras foram preparadas de maneira especial para o teste reológico. Foi feito um molde que permitia a transferência das amostras para o reômetro sem causar danos às mesmas. As amostras foram preparadas com aproximadamente 1 mm de espessura e 20 mm de diâmetro 2 horas antes da

realização do teste e foram incubadas à 37°C com PBS 1x. Devido ao molde diferenciado não foi possível incubar as amostras durante toda a noite à 37°C, pois eram observadas evaporação do PBS e desidratação da amostra.

O teste reológico foi realizado em reômetro do tipo HAAKE RheoStress1 (Thermo Electron Corporation). Foram utilizadas placas paralelas de titânio de 20 mm de diâmetro, com distância de 1 mm, temperatura controlada à 37°C, e uso de um dispositivo “jaqueta” para evitar a evaporação do solvente e desidratação das amostras durante a realização do teste. Inicialmente foi feito um teste de varredura de tensão nas amostras, a fim de determinar a tensão a ser utilizada nos testes de variação de frequência e garantir a operação na região viscoelástica linear. A partir deste teste determinou-se uma tensão de 7 Pa, e foi feito teste de reologia com variação de frequência de 0,01 a 10 Hz, sendo os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') registrados como função da frequência aplicada. O teste de reologia foi realizado em duplicata.

4.1.5.3 Caracterização biológica

4.1.5.3.1 Preparo das células

Foram utilizadas células musculares lisas previamente extraídas da aorta de porcos (PSMCs). As células foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, suspensas em tampão fosfato estéril (PBS 1x, Fisher Bioreagent) e centrifugadas por 5 minutos a 300 g. O sobrenadante foi eliminado, as células ressuspendidas em 10 mL de meio de cultura DMEM 1x (Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco) contendo 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 10% de soro de porco (Invitrogen) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) e colocadas em frascos de cultura. As células foram mantidas em meio de cultura, em incubadora à 37 °C e 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 dias. A confluência era atingida em 5-6 dias, sendo as células usadas na 4ª passagem.

Para utilização das células nos hidrogéis de colágeno, o meio de cultura foi removido dos frascos de cultura e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. As células foram descoladas do fundo da placa com o uso de tripsina-EDTA 1x (Tripsina-EDTA 0,5% 10X, Gibco) diluída em PBS 1x, por 3 minutos à 37 °C. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio de cultura nos frascos. As células foram contadas utilizando câmaras de contagem de células Cellometer® Cell Counting Chambers (Nexcelom Bioscience SD 100).

Para o preparo dos dispositivos (hidrogéis contendo células, *constructs* em inglês) foi utilizado o mesmo protocolo de preparo dos hidrogéis de colágeno descrito na seção 4.1.4, porém as células foram adicionadas antes da adição das microfibras de fibroína e formação do gel. Para isso, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 350 g e ressuspendidas na solução gelificadora, em uma concentração de 10^6 células/mL de solução gelificadora. As células foram homogeneizadas na solução gelificadora e então as microfibras de fibroína foram dispersas na solução gelificadora contendo as células. Um mililitro da mistura foi vertido em placas de Petri de 35 mm de diâmetro interno e a gelificação ocorreu em condições ambiente (25°C), em câmara de fluxo laminar.

Após a gelificação, 2 mL de meio de cultura DMEM/High Glucose (HighClone) contendo 20% de soro fetal bovino (HighClone) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) foram adicionados sobre os dispositivos. As amostras foram mantidas em estufa incubadora à 37°C e 5% de CO_2 por sete dias e o meio de cultura foi trocado no primeiro, terceiro e quinto dia. Também foram preparados dispositivos de colágeno puro (sem microfibras de fibroína) para serem utilizados como controle no estudo e para possibilitar a avaliação da influência da adição das microfibras de fibroína no comportamento celular.

4.1.5.3.2 Proliferação celular

A proliferação celular nos diferentes dispositivos ao longo do período de cultura foi avaliada através do uso de microscópio de contraste de fases (Leica) imediatamente após o preparo dos dispositivos e a cada troca de meio de cultura (dias 1, 3, 5 e 7).

4.1.5.3.3 Contração mediada pelas células

As células, devido à adesão e proliferação, induzem a contração dos dispositivos, expulsando a água do hidrogel e aumentando a densidade do colágeno. Esta característica é comum em dispositivos feitos a partir de hidrogéis de colágeno e foi avaliada pela perda de massa dos dispositivos durante o período de cultura. Para isso, os dispositivos foram pesados imediatamente após o preparo (m_0) e a cada troca do meio de cultura (m_i) em balança analítica. A perda de massa dos dispositivos foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\text{perda de massa (\%)} = \frac{m_0 - m_i}{m_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

As células também foram contadas no último dia de cultura, a fim de verificar a proliferação celular. Para isto, os dispositivos de colágeno foram digeridos com colagenase tipo I (Gibco) (0,5 mg/mL em DMEM) por 3 horas à 37 °C. As células foram então lavadas com PBS e centrifugadas a 350 g por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. A suspensão foi então agitada em um agitador de tubos do tipo vortex por aproximadamente 10 segundos, que permitia a separação entre as microfibras de fibroína e as células. Finalmente, as microfibras foram descartadas e as células foram contadas com o uso de Cellometer[®] Cell Counting Chambers (Nexcelom Bioscience SD 100). Este teste foi realizado em duplicata.

Também foi realizado teste de intumescimento dos dispositivos em meio de cultura, pois a absorção de meio de cultura pelos dispositivos poderia influenciar a medida de massa do teste de contração. Porém, neste caso, não foram adicionadas as células nos dispositivos, sendo assim realizado um teste de intumescimento em meio de cultura nos hidrogéis. Os hidrogéis foram pesados imediatamente após o preparo e foi adicionado meio de cultura no topo dos hidrogéis. A variação de massa dos hidrogéis foi avaliada após 1, 5 e 10 minutos da adição do meio de cultura. Os hidrogéis foram então mantidos à 37 °C e 5% de CO₂ durante sete dias (mesmo período de cultura dos dispositivos) e pesados nos dias 1, 3, 5 e 7.

4.1.5.3.4 Morfologia celular

A morfologia celular foi verificada através de microscopia eletrônica de varredura no sétimo dia de cultura. Para a observação das amostras, foi realizado o mesmo procedimento para fixação das amostras descrito no item 4.1.5.1 (Caracterização morfológica), com o uso de solução de Karnovsky e desidratação pelo método do ponto crítico.

A morfologia e o espalhamento celular nas três dimensões do hidrogel de colágeno foram verificados por microscopia confocal (LSM 5, Zeiss). Para a marcação, as células foram fixadas com solução de formaldeído 3,7% por 10 minutos e a membrana plasmática foi permeabilizada com uso de saponina 1% durante 10 minutos. O citoesqueleto, actina F, foi marcado com faloidina 1 mg/mL, durante 1 hora, à 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente foram feitas lavagens

com PBS 1x e o núcleo das células foi marcado com DAPI 1 mg/mL durante 5 minutos. Ao final as amostras foram lavadas com PBS e mantidas em formaldeído até observação ao microscópio confocal.

4.1.5.3.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular no sétimo dia de cultura foi avaliada pelo uso de teste Live/Dead (Live/Dead[®] Viability/Cytotoxicity kit, Invitrogen). Este teste consiste na incubação dos dispositivos por 15 minutos em solução de PBS 1x contendo 2 µmol/L de calceína e 4 µmol/L de brometo de etídio. Os dispositivos foram então lavados com PBS e um agente *antifade* (Slow Fade[®] Antifade kit, Invitrogen) foi adicionado sobre as amostras, a fim de evitar a perda de fluorescência durante a microscopia. Para a visualização das células foi utilizado microscópio confocal LSM 5 (Zeiss), sendo as células vivas marcadas em verde e as células mortas em vermelho.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Morfologia

Utilizando imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível medir o diâmetro e o comprimento das microfibras de fibroína. As microfibras de fibroína possuíam diâmetro uniforme de $15,05 \pm 1,64 \mu\text{m}$ (média \pm desvio padrão, $n=50$). Entretanto, uma grande variação foi observada no comprimento das microfibras, com valores variando entre $480 \mu\text{m}$ e $1295 \mu\text{m}$. As microfibras de fibroína foram preparadas por moagem, o que impossibilita um controle rigoroso do comprimento das fibras. Por outro lado, observa-se que o diâmetro das microfibras de fibroína não foi afetado pelo uso do moinho e que diferentes casulos do bicho-da-seda apresentam diâmetro bastante regular.

A Figura 8 apresenta o aspecto macroscópico dos hidrogéis de colágeno com e sem microfibras de fibroína. Foi possível obter uma dispersão relativamente uniforme das microfibras de fibroína no hidrogel de colágeno, com as microfibras orientadas aleatoriamente. Com o aumento da quantidade de fibroína observa-se que o material fica mais opaco, com coloração branca, devido à presença das microfibras de fibroína.

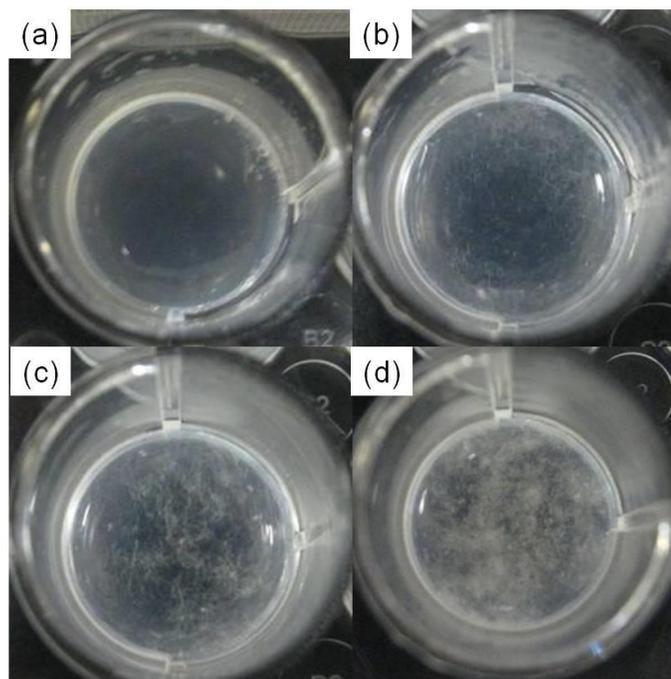


Figura 8: Fotografias dos hidrogéis COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75(d).

Também foi possível observar visualmente que as microfibras de fibroína estavam presentes em diferentes planos no hidrogel de colágeno, indicando que uma boa dispersão das fibras foi alcançada não somente em duas dimensões, mas sim em três dimensões. Este era um desafio inicial do uso de microfibras em hidrogéis, pois caso a gelificação não ocorresse de maneira ideal, as microfibras iriam se depositar no fundo do molde. A Figura 9a mostra as fibras de fibroína em diferentes planos do hidrogel. Utilizando o microscópio óptico, era possível focar em diferentes planos do hidrogel (em z), indicando a presença das fibras bem distribuídas tridimensionalmente.

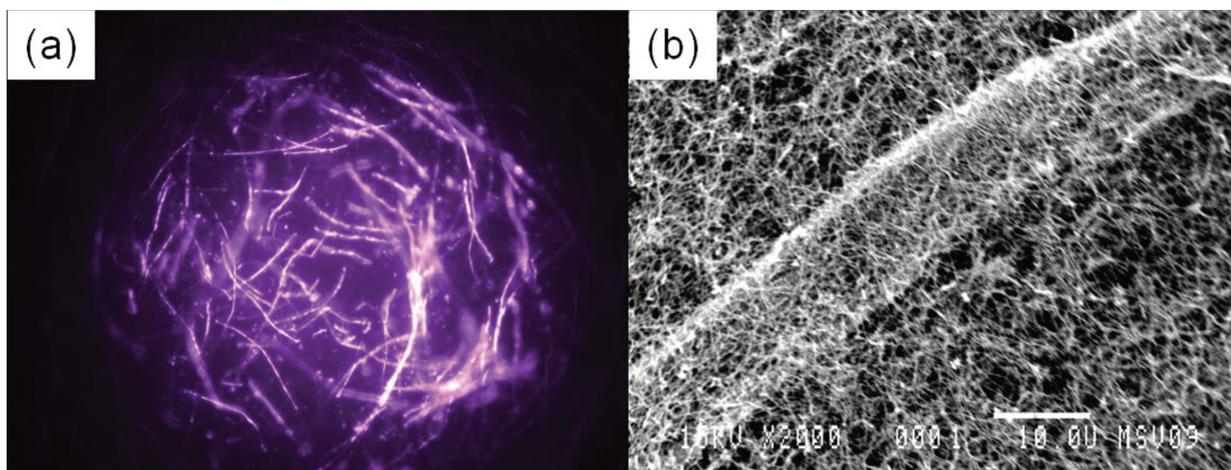


Figura 9: Imagem de microscopia óptica (aumento de 2,5x) do hidrogel COL/SF50 (a) e imagem de MEV mostrando uma microfibrila de fibroína totalmente recoberta por fibrilas de colágeno (b).

Alguns parâmetros necessitam ser cuidadosamente monitorados de maneira a obter uma dispersão ideal das fibras em três dimensões: a quantidade de fibras, a maneira de dispersão das fibras e o tempo de gelificação. Foi observada baixa uniformidade de dispersão das fibras para o hidrogel COL/SF75. Neste hidrogel, a elevada quantidade de microfibras de fibroína impediu a realização de uma boa dispersão e alguns aglomerados de microfibras foram observados no hidrogel, o que indica que possivelmente 75% de microfibras de fibroína já ultrapassaram a quantidade ideal de microfibras que resultam em respostas satisfatórias. Neste estudo, alguns métodos de dispersão das microfibras de fibroína foram testados, como a utilização de agitador mecânico e agitador magnético, que resultaram na formação de emaranhados de microfibras. A melhor maneira de dispersar as microfibras de fibroína foi utilizando um bastão de poliestireno

manualmente, até que as microfibras ficassem totalmente imersas na solução. O tempo de gelificação também deve ser ideal, de maneira a evitar a deposição das microfibras no fundo da placa, que normalmente ocorre em tempos de gelificação muito elevados. Por outro lado, se a gelificação ocorre muito rapidamente, bolhas de ar podem ficar aprisionadas no interior do hidrogel, resultando em erros de medida das propriedades mecânicas.

Neste estudo, a gelificação do colágeno ocorreu em aproximadamente 15 minutos, a pH 7 e à temperatura ambiente (25°C). Estas condições são ideais não somente para manter a dispersão das microfibras de fibroína em três dimensões no hidrogel de colágeno, como também são condições ideais para a cultura celular. As células não são capazes de suportar condições severas como pH alcalino, temperaturas elevadas ou longos períodos sem meio de cultura. Portanto, as condições escolhidas neste estudo para a formação do hidrogel de colágeno são ideais para a dispersão das microfibras de fibroína e também para a adição de células no interior do hidrogel.

A Figura 9b mostra a microscopia eletrônica de varredura do hidrogel de colágeno após secagem pelo método do ponto crítico, chamado de xerogel (hidrogel seco de maneira a manter sua estrutura, sem encolhimento). O xerogel de colágeno é formado por uma rede de fibrilas de colágeno, resultando em uma estrutura altamente porosa, com poros interconectados (Figura 9b). Sabe-se que o pH, a força iônica e a temperatura são parâmetros que influenciam diretamente a gelificação do colágeno, bem como o tamanho das fibrilas e estado de agregação (Achilli e Mantovani, 2010). Porém, estes parâmetros não foram avaliados neste trabalho e os hidrogéis desenvolvidos neste estudo foram feitos sempre nas mesmas condições de preparo, pH, temperatura e força iônica. Pelas imagens de MEV é possível observar as fibrilas de colágeno cobrindo as microfibras de fibroína, indicando uma aderência interfacial adequada entre as microfibras de fibroína e as fibrilas de colágeno. A boa dispersão das microfibras de fibroína no hidrogel de colágeno, bem como a aderência interfacial entre as fibrilas de colágeno e as microfibras de fibroína irão resultar em maior estabilidade do hidrogel e propriedades mecânicas otimizadas.

4.2.2 Propriedades mecânicas

4.2.2.1 Resistência à tração

A Figura 10 mostra uma curva típica de tensão x deformação em ensaio de tração dos hidrogéis preparados neste estudo. As linhas pontilhadas verticais na figura indicam a região na qual foi calculado o módulo de tensão, de 2 a 10% de deformação. Abaixo de 2% de deformação é observada uma resposta tensão-deformação não linear, típica de materiais feitos de colágeno (Abou Neel *et al.*, 2006; Achilli e Mantovani, 2010). De 2% até 10-20% de deformação, observa-se uma região linear, onde a deformação está diretamente relacionada à tensão aplicada. Devido aos hidrogéis COL/SF75 apresentarem comportamento diferente dos demais hidrogéis em valores de deformação superiores a 10%, optou-se por fazer a regressão linear de todos os diferentes hidrogéis de 2 a 10% de deformação, de maneira a avaliar todos os hidrogéis na mesma faixa de deformação.

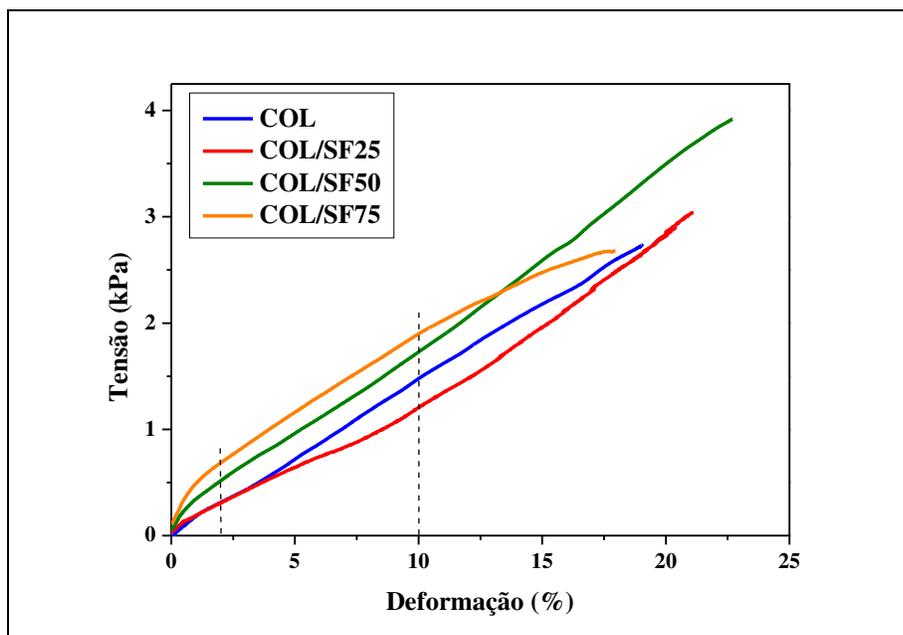


Figura 10: Curva típica de tensão-deformação em teste de tração em anel dos hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína. As linhas pontilhadas verticais indicam a região da regressão linear.

Os resultados de tensão na ruptura, deformação e módulo de tensão são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados do teste de tração em hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína.

Amostras	Tensão na ruptura (kPa)	Deformação (%)	Módulo de tensão (kPa)
COL	3,03 ± 0,77*	19,64 ± 2,58*	14,14 ± 2,07*
COL/SF25	3,32 ± 1,01*	21,05 ± 2,44*	13,59 ± 1,95*
COL/SF50	3,93 ± 0,81*	21,98 ± 2,50*	15,13 ± 1,15*
COL/SF75	2,40 ± 0,29	19,60 ± 5,38*	14,07 ± 2,08*

* na mesma coluna indica que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey-Kramer.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na tensão na ruptura, na deformação e no módulo de tensão entre os hidrogéis estudados. O hidrogel COL/SF75 apresentou diminuição da tensão na ruptura, provavelmente devido à elevada quantidade de fibroína, o que dificultou a dispersão das microfibras e resultou em regiões com pouca uniformidade. Em testes de tração, os defeitos do material são enfatizados, pois a ruptura sempre ocorrerá na região mais fraca, onde trincas ou defeitos estão presentes, justificando a diminuição da resistência à tração do hidrogel COL/SF75.

4.2.2.2 Resistência à compressão

Foi necessário realizar teste de compressão de maneira confinada, pois o hidrogel COL, ao ser retirado do molde, sofria escoamento, o que implicava em diminuição da espessura. Portanto, não foi possível realizar teste de compressão não confinada, já que as condições de cada tipo de amostra seriam diferentes, o que acarretaria em resultados errôneos.

De maneira a evitar a influência do fundo da placa nos resultados, o módulo de compressão foi calculado como a regressão linear entre 0 e 25% de compressão. Valores de

compressão acima de 25% foram considerados como influência do fundo do molde e foram desconsiderados.

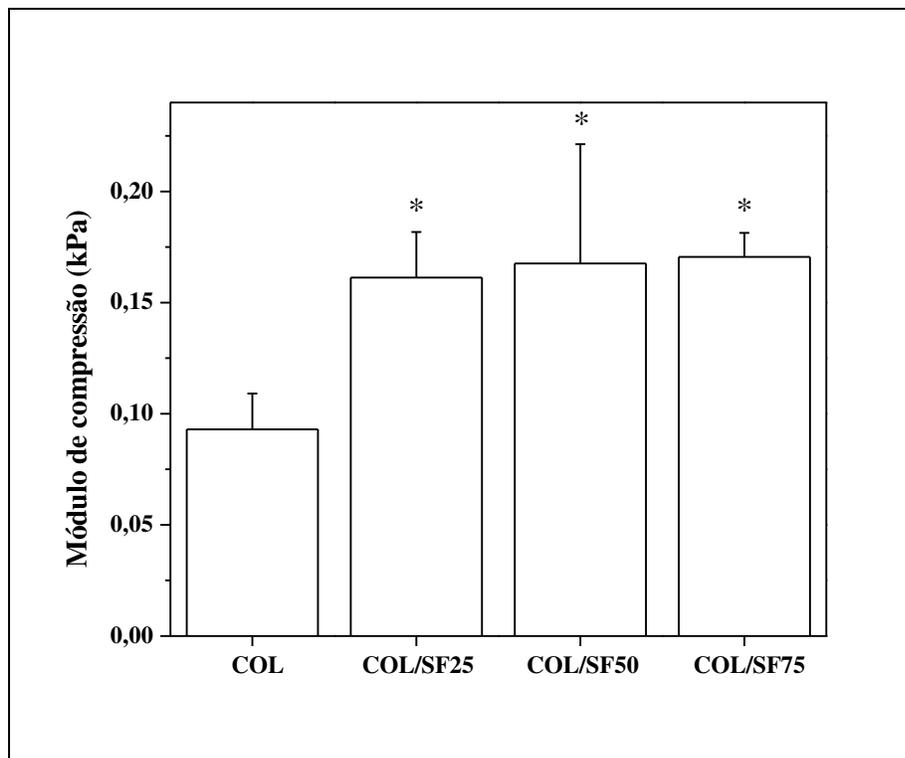


Figura 11: Resultado do teste de compressão confinada dos hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína.

* indica que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A Figura 11 apresenta os valores de módulo de compressão dos hidrogéis de colágeno puro e microestruturados com fibroína. É possível observar que a resistência dos hidrogéis à compressão aumentou significativamente com a incorporação de microfibras de fibroína no hidrogel de colágeno. O aumento do módulo de compressão é menos evidente ao aumentarmos a quantidade de fibroína no hidrogel, enquanto um aumento mais significativo é observado entre o hidrogel COL e os hidrogéis contendo fibroína (COL/SF25, COL/SF50 e COL/SF75). Este resultado está de acordo com as características observadas visualmente e durante o manuseio dos hidrogéis. Ao manusear os hidrogéis, era visível a melhoria promovida pela adição das microfibras de fibroína na integridade estrutural e na resistência mecânica dos hidrogéis de colágeno. Os hidrogéis contendo fibroína eram mais consistentes e capazes de manter seu

formato após serem removidos do molde. Esta melhoria de propriedades aumentava com o aumento da quantidade de fibroína, entretanto, a maior diferença era observada entre o hidrogel COL e os hidrogéis com microfibras de fibroína. O hidrogel de colágeno é mole, deforma facilmente e exsuda muita água após retirada do molde, fato não observado nos hidrogéis contendo fibroína. Não foi observada diferença estatisticamente significativa no módulo de compressão entre os hidrogéis contendo fibroína (COL/SF25, COL/SF50 e COL/SF75).

4.2.2.3 Teste reológico

Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G''), obtidos pelo teste reológico com placas paralelas estão mostrados na Figura 12 (a) e (b), respectivamente. A incorporação de microfibras de fibroína nos hidrogéis de colágeno aumentou os módulos G' (módulo elástico) e G'' (módulo viscoso), sendo este aumento mais pronunciado com o aumento da quantidade de microfibras no hidrogel. A presença das microfibras não influenciou o comportamento reológico do colágeno, uma vez que os hidrogéis continuaram a apresentar o mesmo perfil, porém em maiores valores de G' e G'' .

O módulo de armazenamento (G') aumentou gradualmente com o aumento da frequência para todas as amostras, enquanto o módulo de perda (G'') diminuiu até uma frequência de aproximadamente 0,2 Hz e então começou a aumentar.

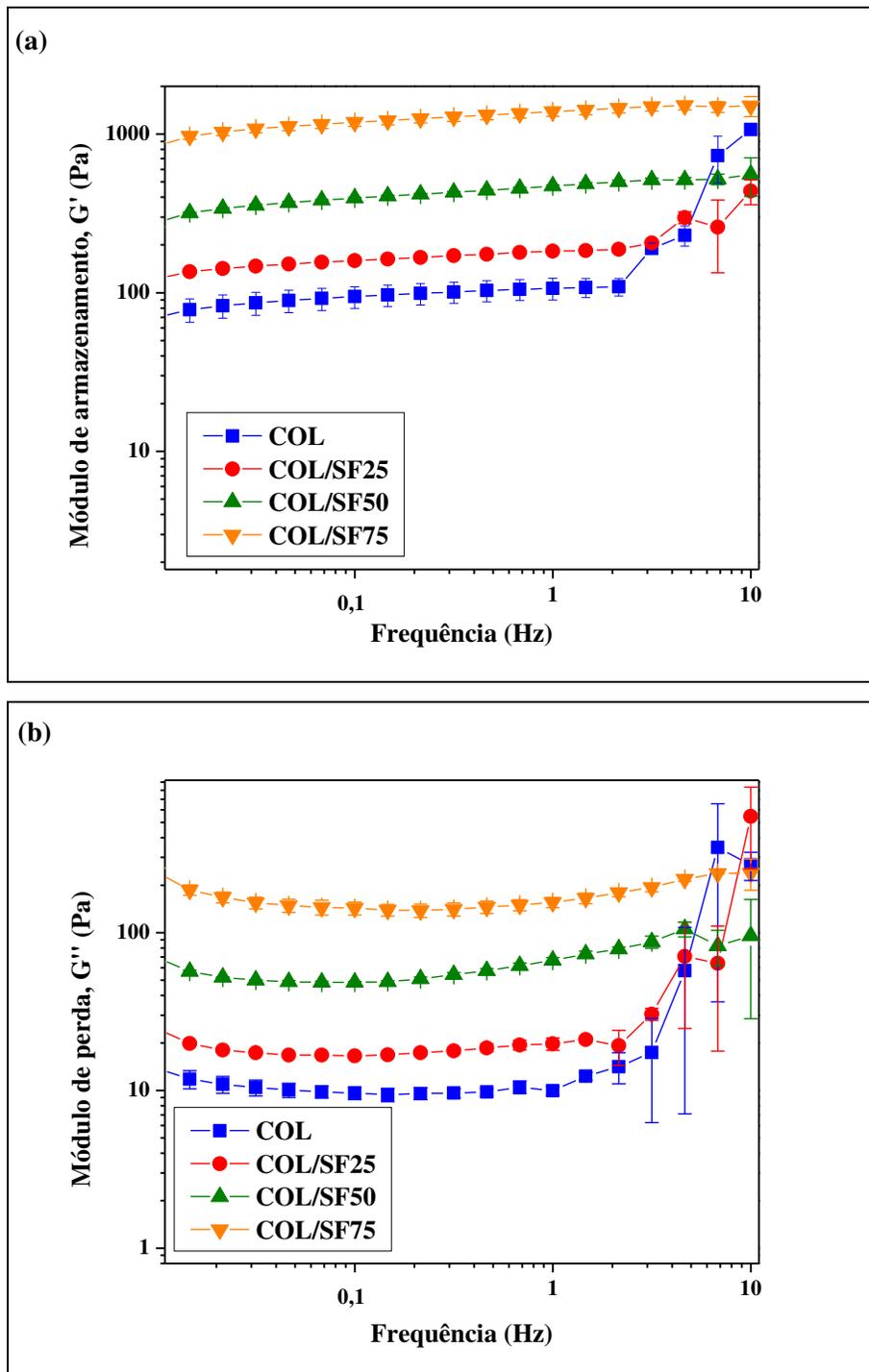


Figura 12: Curvas de módulo de armazenamento G' (a) e módulo de perda G'' (b) em função da frequência.

Para os hidrogéis COL e COL/SF25, em uma frequência de aproximadamente 3 Hz observa-se um aumento brusco dos módulos, acompanhado por grandes barras de erros. Após o

teste, verificou-se que estas amostras estavam danificadas e provavelmente este é o motivo pelo qual os resultados nestas amostras em altas frequências não estão de acordo com o esperado. Provavelmente, por estas amostras serem mais frágeis, em altas frequências saímos da região de viscoelasticidade linear, a amostra é então cisalhada, resultando em valores errôneos dos módulos G' e G'' . Nos hidrogéis com maior quantidade de microfibras de fibroína (COL/SF50 e COL/SF75) este fato não é observado, e a inspeção visual das amostras após o teste não revelou danos nas amostras. Além disso, o aumento da quantidade de fibroína no hidrogel de colágeno aumenta os módulos de armazenamento e de perda, resultando em um material mais resistente e ao mesmo tempo mais elástico. Os hidrogéis de colágeno puro (COL) exibiram maior variabilidade de resultado (maiores barras de erros) em todas as frequências analisadas, o que confirma a heterogeneidade inerente do colágeno. Adicionando microfibras de fibroína, a heterogeneidade do colágeno é menos pronunciada e um material mais reprodutível é obtido.

Em todas as amostras o módulo de armazenamento apresentou valores maiores que o módulo de perda nas frequências analisadas, indicando um comportamento de sólido viscoelástico, típico de hidrogéis de colágeno (Wu *et al.*, 2005; Stuart e Panitch, 2008). Apesar de não terem sido observadas mudança significativa referente à incorporação das microfibras de fibroína nos testes de tração e compressão foi possível verificar pelo teste reológico (ponto de vista microscópico), que a introdução da fibroína aumenta significativamente a elasticidade e resistência do hidrogel de colágeno, atuando na microestrutura do material.

4.2.3 Propriedades biológicas

Para os testes biológicos, células musculares lisas (constituintes da túnica média) foram adicionadas durante o preparo dos hidrogéis de colágeno (com e sem microfibras de fibroína) e os dispositivos foram incubados por sete dias. O dispositivo COL (colágeno puro) foi considerado como controle no estudo e a influência da adição de microfibras de fibroína foi avaliada. A morfologia celular nos dispositivos foi avaliada a cada 2 dias durante todo o período de cultura, conforme mostrado na Figura 13.

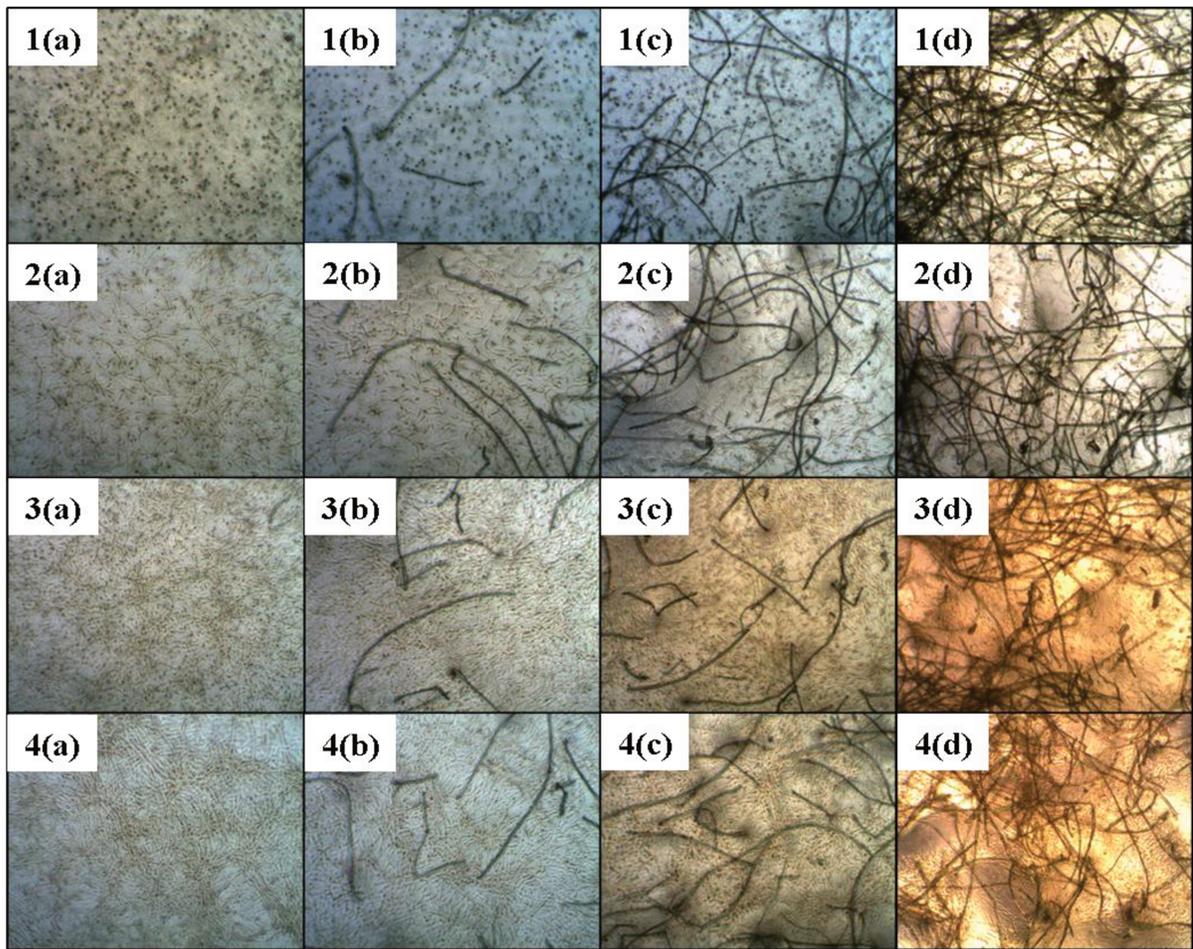


Figura 13: Imagens de microscopia óptica dos dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d), no dia 0 (1), dia 1 (2), dia 3 (3) e dia 5 (4) de cultura.

As células foram capazes de se espalhar e proliferar em todos os dispositivos durante o período de cultura. A morfologia celular arredondada observada no dia 0 (momento em que o dispositivo foi preparado) muda para uma morfologia mais alongada após o primeiro dia de cultura, indicando que a adesão e espalhamento celular foram atingidos no primeiro dia. A proliferação celular foi regular e homogênea em toda a amostra, e o comportamento celular nos dispositivos contendo fibroína foi similar ao do controle (COL).

Infelizmente não foi possível obter imagens satisfatórias de microscopia óptica dos dispositivos no sétimo dia de cultura devido à contração dos hidrogéis, induzida pela ação das células, conforme mostrado na Figura 14. As células induziram a contração do colágeno e aparentemente as fibrilas de colágeno estavam mais concentradas nas bordas da amostra. A região lisa no meio da placa era muito fina, impossibilitando a captura de imagens. Verificou-se

que o aumento da quantidade de microfibras de fibroína aumentou a estabilidade estrutural dos dispositivos e diminuiu a contração do hidrogel. É visível que o diâmetro do controle (COL) é significativamente reduzido após os sete dias de cultura, enquanto que esta redução de diâmetro é menos pronunciada aumentando-se a quantidade de microfibras de fibroína no dispositivo. Foi observada uma redução de 80%, 66%, 51% e 23% do diâmetro dos dispositivos COL, COL/SF25, COL/SF50 e COL/SF75, respectivamente, com relação ao diâmetro inicial da amostra.

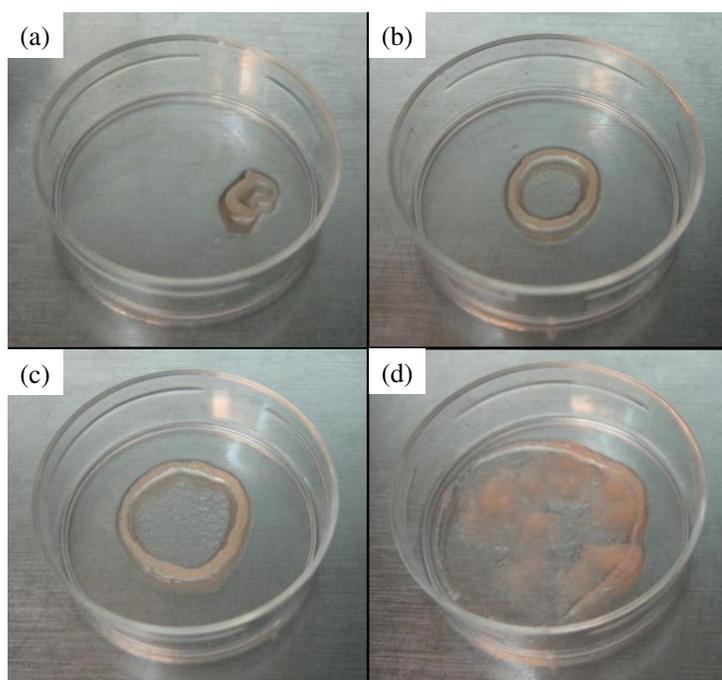


Figura 14: Fotografias dos dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d) no sétimo dia de cultura.

Analisando os dados de contração induzida pelas células em conjunto com os dados reológicos apresentados anteriormente na Figura 12, pode-se supor que a contração induzida pelas células é diminuída devido ao aumento do módulo elástico dos hidrogéis de colágeno na presença das microfibras de fibroína.

A contração induzida pelas células pode ser relacionada com a remodelagem do tecido e ocorre exclusivamente quando os hidrogéis de colágeno são usados como *scaffolds* em engenharia tecidual. A contração induzida pelas células expulsa a água presente no hidrogel de

colágeno, aumenta a densidade do colágeno e, conseqüentemente, aumenta a resistência mecânica do dispositivo (Feng *et al.*, 2003). Entretanto, a possibilidade de preparar dispositivos com melhor estabilidade estrutural pode ser uma ferramenta poderosa no controle da contração mediada pelas células.

A Figura 15 mostra os resultados de perda de massa dos dispositivos devido à contração induzida pelas células. A adição de microfibras de fibroína diminui significativamente a perda de massa dos dispositivos, sendo esta diminuição relacionada à quantidade de microfibras presente no material. A contração parece ter atingido um platô no quinto dia de cultura para o controle (COL) e para o dispositivo COL/SF25, enquanto para os demais dispositivos, a contração parece não ter atingido o equilíbrio após os sete dias de cultura. É provável que a incubação dos dispositivos COL/SF50 e COL/SF75 por um período mais elevado resultaria em estabilização da contração e conseqüente perda de massa. Ainda assim, acredita-se que a perda de massa final dos dispositivos contendo fibroína seria menor do que a do dispositivo de colágeno puro (COL). Isto confirma a obtenção de um material com melhor estabilidade estrutural e que provavelmente apresenta uma maior área para a proliferação celular.

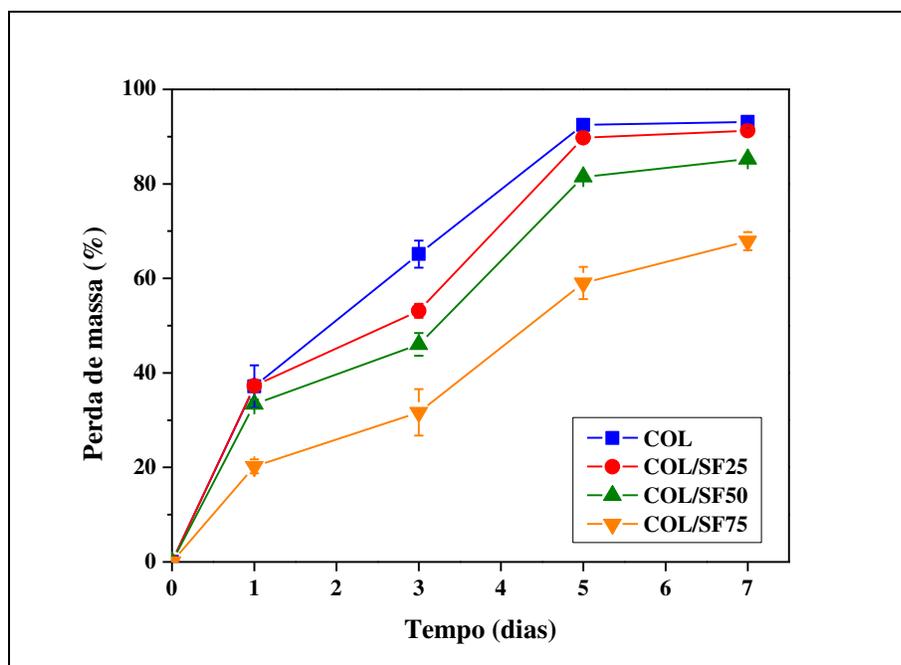


Figura 15: Perda de massa dos dispositivos devido à contração mediada por células.

Para explorar mais detalhadamente a contração dos hidrogéis, foi feita uma contagem das células no último dia de cultura, a fim de verificar se a diminuição da contração estaria realmente ligada à maior resistência mecânica fornecida pela fibroína ou se a proliferação celular era menor nos dispositivos com fibroína, resultando em menor contração induzida pelas células. A Figura 16 mostra os resultados da contagem celular, sendo o percentual de proliferação calculado como função da concentração inicial de células nos dispositivos (10^6 células/mL).

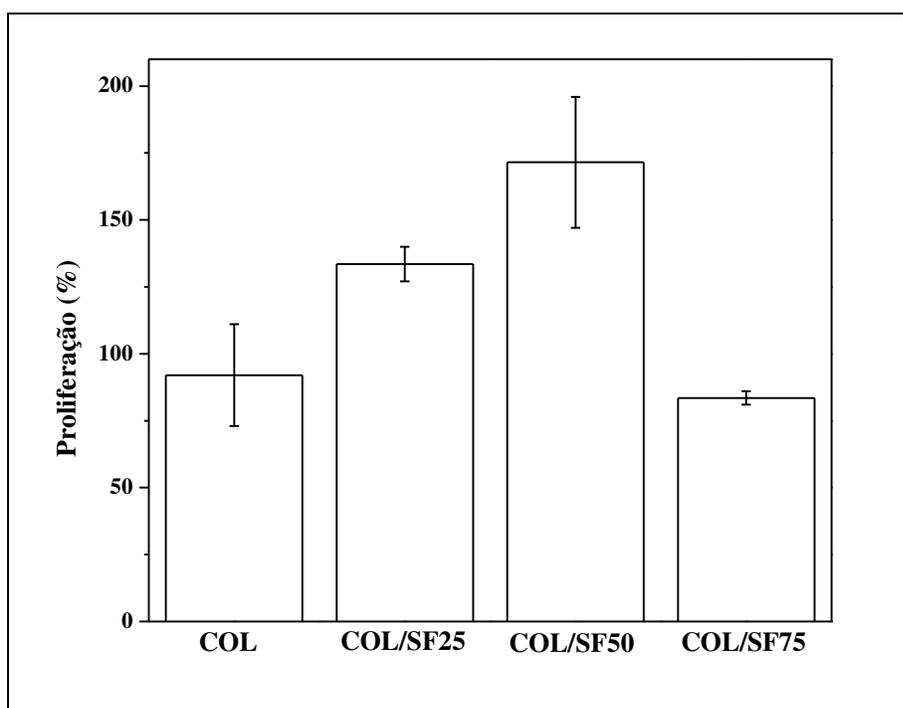


Figura 16: Percentual de proliferação celular nos dispositivos no sétimo dia de cultura celular.

Os resultados foram surpreendentes e mostram que a presença de microfibras de fibroína, até determinada quantidade, age de maneira a aumentar a proliferação celular. Este aumento está possivelmente relacionado ao aumento da estabilidade estrutural do hidrogel e consequente aumento da área superficial disponível para a proliferação celular. Na realidade, um aumento de aproximadamente 45 e 86% na proliferação celular foi obtido para os dispositivos COL/SF25 e COL/SF50, quando comparados com o controle (COL). Porém, em conteúdos elevados de microfibras (COL/SF75) a proliferação celular é apenas comparável à do controle, não maior. Duas hipóteses são sugeridas para este fato: 1) o conteúdo elevado de microfibras de fibroína atua como uma barreira mecânica para a difusão de metabólitos e proliferação celular, atingindo seu

valor máximo entre 50 e 75% de fibroína, ou 2) algumas células podem ter ficado aprisionadas nos emaranhados das microfibras de fibroína devido à separação pouco efetiva, resultando em uma contagem errônea do número de células no dispositivo. É importante ressaltar que o método utilizado para a contagem das células utiliza pequenas alíquotas da amostra de suspensão de células, que podem estar bem dispersas ou podem estar formando grandes aglomerados. Portanto, caso as células não estejam bem dispersas, o método de contagem de células pode acarretar em um grande erro da medida. De qualquer maneira, este teste foi realizado apenas para verificar a tendência da proliferação celular nos dispositivos, e os valores podem ser diferentes para outras condições de cultura ou outros tipos de células.

Também foi feito um teste de intumescimento em meio de cultura dos hidrogéis sem células, a fim de verificar se o intumescimento poderia causar uma variação significativa na massa dos hidrogéis, influenciando as medidas de perda de massa. O intumescimento ocorreu principalmente no primeiro minuto, sendo o equilíbrio estabelecido após 10 minutos de contato dos hidrogéis com o meio de cultura. O intumescimento do hidrogel COL (controle) foi de 6,65%, enquanto os hidrogéis COL/SF25, COL/SF50 e COL/SF75 apresentaram intumescimento de 4,52, 4,27 e 4,55%, respectivamente. O intumescimento dos hidrogéis contendo fibroína foi menor que o controle (COL), pois as microfibras de fibroína são menos hidrofílicas que o colágeno e possuem baixa absorção de água. Os valores de intumescimento não são elevados (4,2 a 6,6%) e não representam um fator significativo que possa influenciar a validade das medidas de perda de massa.

Analisando em conjunto os dados de perda de massa nos dispositivos (Figura 15) com os dados de proliferação celular (Figura 16), pode-se supor que a menor perda de massa do dispositivo COL/SF75 pode estar associada à presença de quantidade elevada de fibroína e também à menor proliferação celular neste dispositivo. Os demais dispositivos parecem seguir uma tendência associando redução de diâmetro (Figura 14) com perda de massa e proliferação celular. Com relação ao intumescimento, não é observada uma diferença significativa nos valores de intumescimento dos diferentes dispositivos, portanto considerou-se que o intumescimento não exerce influência significativa nos dados de perda de massa e proliferação celular.

Em resumo, a incorporação de microfibras de fibroína nos dispositivos resultou em um material com melhor estabilidade estrutural, com menor contração induzida pelas células e com melhores características para a proliferação celular.

As imagens dos dispositivos obtidas por MEV no sétimo dia de cultura são mostradas na Figura 17, onde é possível observar que as células formaram uma camada contínua e homogênea nos dispositivos.

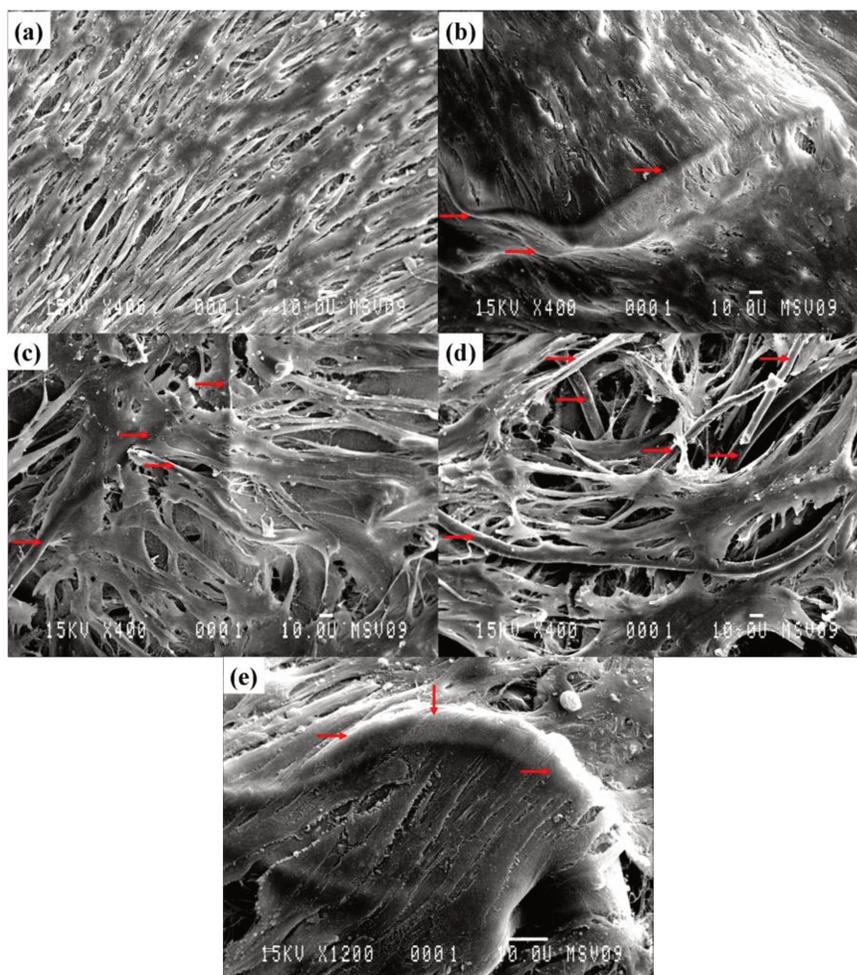


Figura 17: Imagens de MEV no sétimo dia de cultura dos dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d); microfibra de fibroína completamente envolta por células (e).

Setas vermelhas indicam microfibras de fibroína.

As microfibras de fibroína estão indicadas pelas setas vermelhas na Figura 17 e foram envolvidas pelas células, sugerindo que estes dispositivos representam um ambiente adequado para a adesão e proliferação celular. No dispositivo COL/SF25 verifica-se que as microfibras de fibroína estão completamente envoltas pelas células. Já nos demais dispositivos (COL/SF50 e COL/SF75) algumas microfibras estão envoltas pelas células e outras não, possivelmente devido

ao aumento da área superficial nestes dispositivos induzido pela contração reduzida dos mesmos. Acredita-se que aumentando o tempo de cultura é possível obter um recobrimento total dos dispositivos pelas células, similar ao observado para o controle (COL) e para o dispositivo COL/SF25.

O espalhamento das células nas três dimensões dos dispositivos foi verificado através de reconstituição tridimensional de imagens obtidas por microscopia confocal, na qual foi feita a marcação do núcleo (azul) e do citoesqueleto (vermelho) das células, conforme visualizado na Figura 18. As microfibras de fibroína foram capazes de incorporar os marcadores, apresentando coloração rosa conforme mostrado na figura. As células foram capazes de espalhar regularmente também em z, dentro do dispositivo e não apenas em sua superfície e estão bem instaladas e com formato alongado, típico de células musculares lisas.

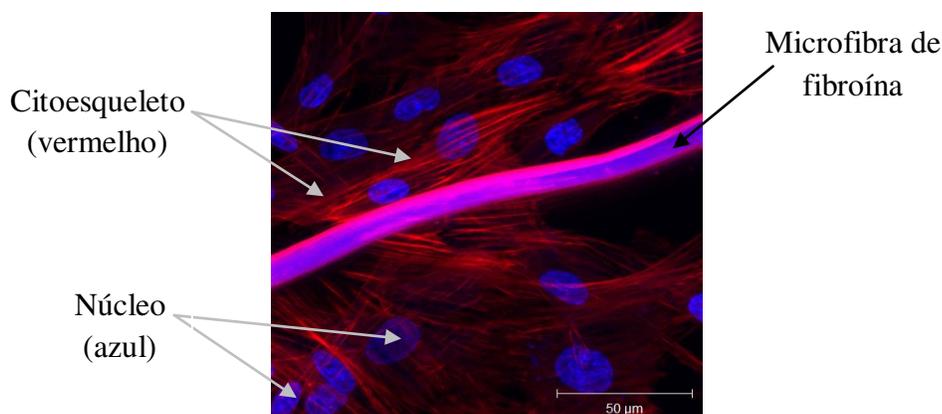


Figura 18: Reconstituição tridimensional do espalhamento das células nos dispositivos.

Finalmente, a citotoxicidade dos dispositivos foi avaliada por teste de viabilidade celular Live/Dead, sendo as células vivas marcadas em verde pela calceína e as células mortas marcadas em vermelho pelo brometo de etídio (Figura 19). As microfibras de fibroína foram capazes de incorporar os dois marcadores, resultando em microfibras de coloração azul. Entretanto, as imagens foram feitas em locais onde não havia a presença das microfibras de fibroína, pois como a coloração das microfibras era muito intensa acabava mascarando a marcação das células.

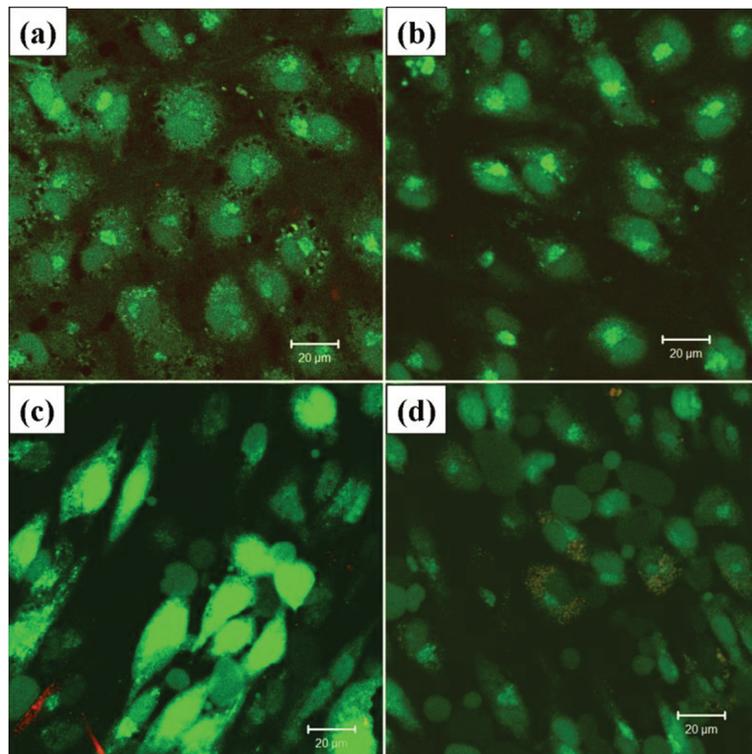


Figura 19: Teste de viabilidade celular para os dispositivos COL (a), COL/SF25 (b), COL/SF50 (c) e COL/SF75 (d) no sétimo dia de cultura.

Os dispositivos contendo microfibras de fibroína (Figura 19b, c e d) apresentaram células vivas em quantidade comparável com a do controle (COL, Figura 19a). Apenas uma ou duas células mortas são observadas em todos os dispositivos, o que indica que o material desenvolvido neste estudo representa um ambiente adequado para a adesão, espalhamento e proliferação celular, sem apresentar efeitos tóxicos às células.

4.3 Conclusão Parcial

A combinação do hidrogel de colágeno com as microfibras de fibroína possibilitou o desenvolvimento de um material uniforme, com boa dispersão tridimensional, maior resistência mecânica e melhores propriedades biológicas. O hidrogel COL/SF50 mostrou ser o mais adequado dentre os hidrogéis estudados, por apresentar maior resistência mecânica e maior proliferação celular.

Foi possível obter hidrogéis de colágeno microestruturados com fibroína de seda, sem efeitos adversos às células. Foi observado um aumento na proliferação celular na presença de microfibras de fibroína quando comparada com o hidrogel de colágeno puro, que é conhecidamente uma ótima matriz para cultura de células e reconstituição de tecidos biológicos. O material desenvolvido parece ser bastante promissor no desenvolvimento de substitutos vasculares.

5 FILMES NANOMÉTRICOS COM FIBROÍNA DE SEDA

Neste capítulo descreve-se a obtenção de filmes com espessura nanométrica pelo método LbL (*layer-by-layer*) com controle sobre a deposição de fibrilas de fibroína, visando aplicação na área de biomateriais.

A molécula de fibroína de seda é capaz de se auto-organizar na forma de fibrilas nanométricas. Porém, os fatores que influenciam esta auto-organização não são completamente compreendidos na literatura. Alguns autores afirmam que este processo ocorre devido à fatores como a concentração da solução e carga (Lu *et al.*, 2012). Enquanto outros autores acreditam que as nanofibrilas são formadas durante a transição para a estrutura folha- β (Chen *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2009).

Esta complexa estrutura da fibroína é ainda mais interessante quando confinada na escala nanométrica e em combinação com outros polímeros. A solução de fibroína pode ser utilizada no preparo de filmes ultrafinos pelo método LbL. O primeiro e único relato existente na literatura sobre a formação de fibrilas de fibroína em filmes LbL foi realizado por nosso grupo de pesquisa (Nogueira *et al.*, 2010b) na deposição de filmes de quitosana com fibroína. Foi possível obter fibrilas alinhadas na direção de imersão do substrato nas soluções poliméricas, além de se obter um alinhamento anisotrópico quando o substrato era girado em 90°. Entretanto, o mecanismo de formação das fibrilas de fibroína nos filmes LbL não foi elucidado e foi sugerido que a solução utilizada para dissolver a fibroína, o substrato utilizado, a etapa de secagem entre cada camada e a utilização de quitosana em pH 6 foram os principais fatores que influenciaram a auto-organização da fibroína na forma de fibrilas.

Desta maneira, surgiram uma série de questões acerca destes sistemas, tais como: Por que as fibrilas de fibroína são formadas? Qual a influência do substrato na deposição das fibrilas? Qual a influência dos polímeros participantes do LbL na deposição das fibrilas? Qual a influência do tipo de solução utilizada para dissolver a fibroína na deposição das fibrilas? Qual a contribuição das fibrilas em termos de propriedades mecânicas? Estes filmes podem ser usados como padrões para a orientação da adesão e crescimento celular? Para tentar responder estas questões esta etapa da tese foi desenvolvida.

Buscou-se entender melhor a formação de filmes LbL com fibroína, sendo possível controlar a deposição de fibrilas de fibroína dependendo do par catiônico utilizado com a fibroína

na deposição dos filmes. Para isso foram escolhidos dois polímeros como pares catiônicos para a fibroína: a quitosana, cuja capacidade de deposição de fibrilas de fibroína em filmes LbL já havia sido comprovada, e o hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH), que é um polieletrólito fraco, com alta densidade de carga positiva e baixa capacidade de formação de ligações de hidrogênio.

Na primeira parte do trabalho foi estudada a influência da solução utilizada para dissolver a fibroína, do tipo de substrato e do par polimérico na formação de fibrilas de fibroína nos filmes LbL. Em seguida foram verificadas as propriedades químicas, mecânicas e biológicas dos filmes, além de ser analisada a capacidade do padrão de alinhamento das fibrilas em guiar a adesão e proliferação celular, visando aplicações na reconstituição de tecido muscular.

Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com o grupo coordenado pelo Prof. Michael Rubner (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA), durante realização de doutorado-sanduíche, no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Preparo das soluções de fibroína, quitosana e PAH

Foram utilizados casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, fornecidos pela fiação de seda Bratac (Bastos/Brasil). Os casulos foram lavados em solução aquosa de Na_2CO_3 1 g/L, durante 30 min, em banho termostaticado, à temperatura de 85 °C, para a remoção da sericina. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final, as fibras de fibroína foram lavadas com água destilada em abundância. As fibras foram secas à temperatura ambiente por 24 a 48 h. As fibras secas e livres de sericina foram moídas em moinho de facas com rotor tipo ciclone (TE-651/2, Tecnal) até fração passante na peneira mesh nº 10 (partícula com 2 mm de diâmetro) para facilitar sua dissolução. Dois tipos diferentes de solução foram utilizados para dissolver a fibroína, em uma concentração de 20 g/L: (1) $\text{LiBr}:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (45:44:11, em massa), à 90°C e (2) $\text{CaCl}_2:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:8 molar) à 85 °C. A solução salina de fibroína foi dialisada em água ultrapura por 3 dias, à 10 °C, para a remoção dos sais da solução, utilizando um Slide-a-Lyzer dialysis cassette (MWCO 3500, Pierce). A concentração final da solução aquosa de fibroína era de aproximadamente 8 g/L e foi diluída com água ultrapura até 0,15 g/L. A concentração da solução aquosa (após diálise) foi determinada vertendo a solução em placa de Petri e pesando a massa seca remanescente após a completa evaporação da solução (condições ambiente por aproximadamente 48 h, até atingir o equilíbrio).

Foi utilizada quitosana (CHI) de baixa massa molecular (50.000 g/mol, Sigma Aldrich, USA), extraída de carapaças de caranguejo, com um grau de desacetilação mínimo de 85%. A quitosana foi dissolvida em solução de ácido acético 0,25 mol/L, para concentração final de 1 g/L. Após o preparo, o pH da solução foi ajustado para 6 com NaOH 5 mol/L e a solução foi filtrada utilizando membrana com poros de 0,45 μm para remover impurezas.

O hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH) (56.000 g/mol, Sigma Aldrich) foi dissolvido em água ultrapura até concentração final de 1 g/L. O pH da solução foi ajustado para 6 com NaOH 1 mol/L e a solução foi filtrada utilizando membrana com poros de 0,45 μm , na tentativa de se assemelhar ao máximo às condições de preparo da solução de quitosana.

5.1.2 Preparo dos substratos

Foram utilizados como substratos lâminas de silício e de vidro. As lâminas de silício foram limpas por plasma de oxigênio. Já as lâminas de vidro foram submetidas a um processo de limpeza consistindo em sonicação por 15 minutos com detergente 2% (Micro 90), seguido por sonicação com NaOH 1 mol/L por 15 minutos e sonicação com água ultrapura por 10 minutos. Os métodos utilizados para limpeza das lâminas de vidro e de silício também proporcionam um aumento da densidade de cargas negativas na superfície destes substratos, permitindo assim a deposição da primeira camada de polication.

Os dois tipos de substratos foram utilizados devido à exigência de cada análise realizada. Por exemplo, para o teste de intumescimento dos filmes é necessário utilizar o silício como substrato, uma vez que o teste é realizado através de elipsometria. Por outro lado, para os testes com células, é necessário utilizar as lâminas de vidro como substrato, uma vez que elas permitem a visualização das células através de microscópio invertido. As lâminas de silício são constituídas por aproximadamente 99% de silício em sua forma cristalina enquanto as lâminas de vidro são constituídas por 70-74% de SiO₂.

Após a limpeza, os substratos foram funcionalizados com pré-camada de PDAC/SPS [Poli(cloreto de dialildimetil amônio)/Poli(4-estireno sulfonato de sódio)] a fim de disponibilizar uma grande quantidade de carga negativa na superfície do substrato para viabilizar a deposição da primeira camada de quitosana ou PAH no substrato. As soluções de PDAC e SPS foram preparadas em concentração de 0,01 mol/L em 100 mmol/L de NaCl. Tanto as soluções de polímero quanto a água de lavagem tiveram pH ajustado para 4. Para a construção da pré-camada, os substratos foram imersos nas soluções poliméricas por 10 minutos, em seguida, duas etapas de lavagem por 2 e 1 minuto após cada deposição de polímero foram realizadas. Para a pré-camada utilizada neste estudo foram construídas 15 bicamadas de PDAC/SPS.

Também foram utilizadas lâminas de quartzo para a análise de dicroísmo circular e cristal de ZnSe para as medidas de FTIR em transmissão. Porém, para estes dois casos não foi utilizada pré-camada no substrato pois poderia gerar resultados errôneos devido à presença dos polímeros da pré-camada.

5.1.3 Preparo dos filmes pelo método *layer-by-layer*

Para o preparo dos filmes multicamadas foi utilizado o método de imersão do substrato em solução polimérica, no modo estático. Foi utilizado o equipamento Micron DS 50, da Zeiss. Os substratos foram mergulhados nas soluções de quitosana (CHI) ou PAH por 10 minutos seguido por três etapas de lavagem em água ultrapura por 2, 1 e 1 minutos sob agitação vertical. Os substratos foram então secos por 5 minutos em condição ambiente, sem aumento de temperatura ou utilização de fluxo de ar. Após a secagem os substratos foram imersos na solução de fibroína (SF) por 10 minutos, então, as mesmas etapas de lavagem e secagem descritas para a quitosana e PAH foram realizadas. Após a secagem da fibroína tem-se a formação de uma bicamada. Neste trabalho, utilizaremos a nomenclatura (CHI/SF)_n ou (PAH/SF)_n, onde n é o número de bicamadas depositadas. Será utilizada a notação (CHI/SF)_{LiBr} para indicar que foi utilizada a solução (1) na dissolução da fibroína e (CHI/SF)_{CaCl2} quando utilizada a solução (2). As diferentes soluções foram utilizadas somente para os filmes multicamadas preparados com quitosana. Para os filmes com PAH foi sempre utilizada a solução (1) para dissolução da fibroína. Estas soluções foram escolhidas por serem as mais utilizadas na literatura para a dissolução da fibroína e também para verificar se o tipo de solução iria influenciar a deposição das fibrilas de fibroína, conforme sugerido por Nogueira *et al.* (2010).

5.1.4 Caracterizações

Todos os testes de preparo e caracterização dos filmes multicamadas ultrafinos com fibrilas de fibroína foram realizados no laboratório coordenado pelo Prof. Michael Rubner, no Departamento de Engenharia e Ciência dos Materiais do Massachusetts Institute of Technology (MIT). Apenas o teste de nanoindentação em AFM foi realizado no Laboratório de Nano e Biosistemas, do Instituto de Física da UNICAMP. Todos os testes biológicos foram realizados sob o auxílio e supervisão de Thomas Crouzier.

5.1.4.1 Espessura e formação dos filmes

A espessura dos filmes secos depositados em lâminas de silício foi medida por elipsometria (Gaertner Scientific 3), em comprimento de onda de 633 nm e ângulo de incidência de 70°. A elipsometria é uma técnica não destrutiva capaz de detectar a mudança do estado de polarização da luz incidente causada pela reflexão na superfície da amostra.

Já a espessura dos filmes secos depositados em lâminas de vidro foi determinada por perfilometria, utilizando um Tencor P-16 Surface Profilometer. O perfilômetro possui uma ponta de diamante que faz uma varredura sobre a amostra. Para determinar a espessura dos filmes, é feito um rasgo nos filmes com auxílio de lâmina. A ponta de diamante, ao fazer a varredura no filme, acaba formando um degrau ao passar pelo rasgo e este degrau corresponde à espessura do filme. Foi utilizada uma força da ponta de diamante sobre as amostras de 2 mg, com velocidade de varredura de 50 µm/s.

Foi verificado através de testes preliminares que as técnicas de elipsometria e perfilometria forneciam os mesmos resultados de espessura quando utilizadas no mesmo filme. Desta maneira se definiu que ambas as técnicas poderiam ser aplicadas para a determinação da espessura dos filmes. Também foi verificado que filmes depositados sob as mesmas condições, tanto em substrato de vidro quanto de silício, apresentavam valores muito similares de espessura.

O intumescimento dos filmes foi determinado correlacionando a espessura no estado seco e úmido dos filmes (Equação 2). Para isso, os filmes foram colocados em uma célula de quartzo e a espessura da amostra seca foi medida. Em seguida foi adicionado água ultrapura na célula de quartzo e a espessura dos filmes úmidos foi medida após 5 minutos de imersão em água, tempo necessário para atingir o equilíbrio. Foi utilizado um elipsômetro espectroscópico J.A. Woollam XLS-100, de 400 a 1000 nm, com ângulo de incidência de 70°. Para cálculo das espessuras foi utilizado o software WVASE32.

$$GI = \frac{(e_f - e_i)}{e_i} \cdot 100\% \quad (2)$$

onde: GI é o grau de intumescimento; e_f é a espessura final do filme úmido (nm); e_i é a espessura inicial do filme seco (nm).

A construção dos filmes também foi monitorada com uma microbalança de cristal de quartzo com monitoramento da dissipação (QCM-D, Q-Sense AB, Suécia). Foi utilizado o sistema com câmara aberta (Figura 20), à 25°C e cristal de quartzo recoberto com SiO₂, de maneira a se assemelhar ao sistema real de formação dos filmes em lâminas de silício e vidro. O QCM-D é uma técnica que mede a variação na frequência de ressonância do cristal de quartzo, Δf , e na energia de dissipação, ΔD , quando o material é adsorvido no cristal. Um campo elétrico alternado é aplicado nos eletrodos de ouro presentes na parte superior e inferior que recobrem a superfície do cristal de quartzo. Com isso, o cristal é excitado na sua frequência fundamental (~5 MHz), se deslocando com amplitude lateral da ordem de um a dois nanômetros, e as medições são realizadas no terceiro, quinto, sétimo, nono e décimo primeiro *overtone*s simultaneamente. As mudanças na frequência e dissipação são medidas na deposição de cada camada de polímero e estas mudanças podem ser relacionadas com a espessura do filme úmido sendo depositado através do uso de modelos viscoelásticos. Uma diminuição na frequência é associada com um aumento na massa adsorvida no cristal (deposição de polímero). Para construção dos filmes na microbalança de quartzo foi utilizado o mesmo procedimento utilizado para construção dos filmes nos substratos de vidro ou silício. Para isso foram adicionados 2 mL de quitosana ou PAH no cristal. Após 10 minutos (tempo para adsorção na superfície) o polímero foi removido e foram adicionados 2 mL de água ultrapura para lavagem, mantida na câmara por 2 minutos. Mais duas lavagens foram feitas com água ultrapura, por 1 minuto cada. Então a água foi removida e a câmara foi aberta, deixando-se o material secar por 5 minutos em condição ambiente. As mesmas etapas foram repetidas com a solução de fibroína, possibilitando a formação de uma bicamada. Para a análise de QCM-D foram construídas 5 bicamadas.

Para determinar a massa depositada e espessura das camadas do filme no estado úmido foi realizada a modelagem dos dados utilizando o programa QTools e considerando o modelo viscoelástico de Voigt, normalmente utilizado em filmes altamente hidratáveis e não rígidos. Para a modelagem foram utilizados os seguintes parâmetros: densidade do fluido de 0 a 30000 kg/m³, viscosidade do fluido de 0 a 1x10¹⁴ kg/m.s, densidade da camada de 0 a 30000 kg/m³, viscosidade da camada entre 0 e 100 kg/m.s, cisalhamento da camada entre 0 e 1x10¹⁴ kg/m.s² e espessura da camada entre 0 e 1 m.

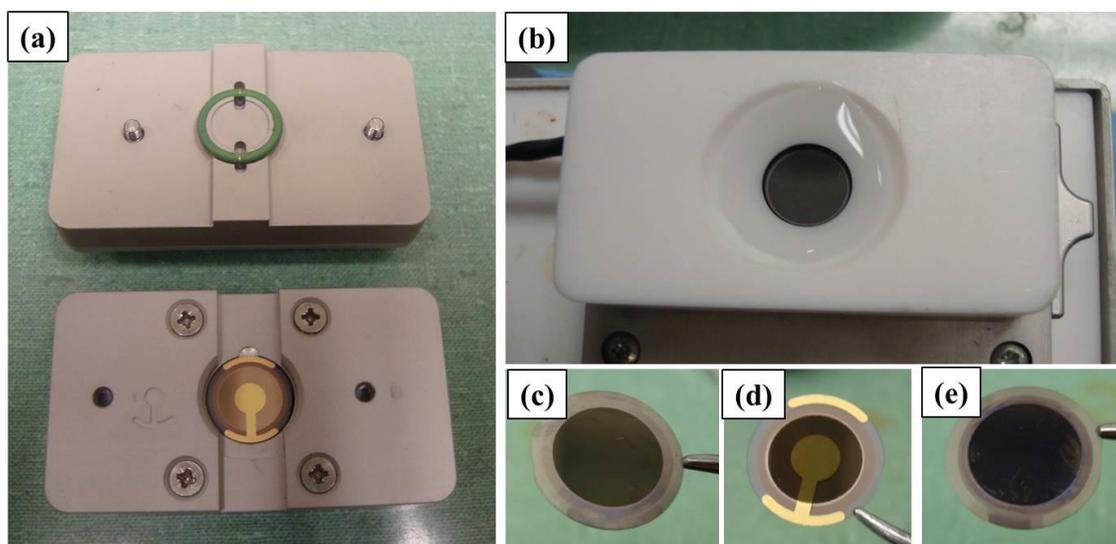


Figura 20: Fotografia do equipamento de QCM-D. Vista interna da câmara com sensor montado (a); Câmara aberta do QCM-D contendo água de lavagem (b); Parte externa do sensor, que fica em contato com as soluções poliméricas (c); Parte interna do sensor (d) e Parte externa do sensor após os experimentos de deposição (CHI/SF)₅ (e).

Medidas de ângulo de contato foram realizadas em Video Contact Angle System VCA 2000 (AST Inc.), a fim de verificar a molhabilidade da superfície dos filmes. Isto é possível pois quando um líquido é colocado sobre uma superfície sólida poderá ocorrer o seu espalhamento na superfície ou ele irá formar uma gota esférica. O ângulo formado entre o líquido e a superfície mostra o grau de interação entre os dois materiais, indicando a molhabilidade da superfície. Para o caso de biomateriais, o ângulo de contato fornece uma previsão da afinidade das células pela superfície, uma vez que as células preferem ancorar em superfícies hidrofílicas, ou seja, com menor ângulo de contato. Para realização do teste, uma gota de água ultrapura foi colocada em contato com os filmes ultrafinos e o ângulo de contato formado entre a gota e a superfície do filme foi medido com o software VCAOptima.

Alguns testes também foram realizados para verificar a estabilidade dos filmes LbL com fibroína de seda. Para isso, o filme (CHI/SF_{LIBT})₃₀ depositado em lâminas de vidro e silício foi imerso em etanol 70% durante 20 minutos. Foi feita a medida da espessura do filme seco antes e após a imersão em etanol, para verificar se ocorria encolhimento ou intumescimento do filme nestas condições. Para os filmes depositados em lâminas de silício a espessura do filme seco foi verificada por elipsometria, enquanto para os filmes depositados em vidro a espessura do filme

seco foi analisada por perfilometria. A espessura dos filmes secos também foi analisada após 7 dias de imersão em água, a fim de se determinar a estabilidade dos filmes. Qualquer variação na espessura seria indício de filmes instáveis e solúveis em água.

5.1.4.2 Caracterização morfológica

As fibrilas de fibroína foram visualizadas utilizando microscópio fluorescente Axioplan 2 (Zeiss) na região da luz visível. Para os filmes depositados em vidro, foi feita a incorporação de solução de rodamina 1 mg/mL em uma diluição de 1:200, por 2 h. Sabe-se que a rodamina é incorporada na fibroína, permitindo então a visualização das fibrilas no substrato de vidro, através da utilização do microscópio fluorescente com filtro apropriado para a rodamina.

A microscopia de força atômica (AFM) foi realizada para verificar a topografia dos filmes e a presença das nanofibrilas de fibroína. A técnica consiste na varredura da amostra por uma sonda, resultando em imagens tridimensionais de alta resolução. Foi utilizado um Veeco/Digital Instruments Nanoscope IV Dimension 3100 no modo contato intermitente (*tapping mode*), com a superfície dos filmes exposta ao ar.

5.1.4.3 Caracterização química

Através da espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é possível verificar a composição química das amostras. As moléculas são identificadas pela comparação dos valores de energia de radiação infravermelha absorvida, uma vez que cada molécula possui um espectro de vibração característico. Além disso, para o caso da fibroína, a localização das bandas de amida permite identificar a conformação da estrutura secundária da mesma. Foi utilizado o espectrofotômetro Nicolet 6700 FTIR (Thermo Scientific), sendo analisados os filmes com 20 bicamadas depositados em cristal de ZnSe. Os espectros foram medidos em transmitância, pelo acúmulo de 68 scans, resolução de 4 cm^{-1} , em comprimento de onda de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

A técnica de dicroísmo circular (CD) é utilizada para determinar a estrutura secundária de proteínas. As medidas de CD foram realizadas em um espectrômetro Aviv Circular Dichroism Spectrometer Modelo 202 em atmosfera de N_2 . Os espectros foram realizados de 250 a 195 nm, com largura de banda de 1 nm, passo de 0,5 nm e acúmulo de 3 scans. Foram depositadas 20 bicamadas dos filmes ultrafinos em lâminas de quartzo para a análise de CD. A solução de

fibroína 0,15 g/L também foi analisada em cubeta de quartzo de 0,1 cm de espessura. A elipticidade residual média foi calculada pela Equação 3 (Li *et al.*, 2001):

$$\Theta = \Theta_{obs} \frac{78}{10lc} \quad (3)$$

onde: Θ é a elipticidade residual média (grau.cm²/dmol), Θ_{obs} é a elipticidade observada (graus), 78 é a massa molecular residual média da fibroína, l é o comprimento do caminho óptico (cm) e c é a concentração da proteína (g/mL).

5.1.4.4 Caracterização mecânica

A caracterização mecânica dos filmes multicamadas foi realizada através de medidas de nanoindentação em microscópio de força atômica (Agilent 5500). Curvas de força-deslocamento foram obtidas com ponteiros de cristal de silício, modelo NSG03/Au, da marca NT-MDT. A constante de mola da ponteira foi determinada experimentalmente, apresentando valor de 0,27 N/m. A indentação foi realizada em uma estrutura com isolamento acústico, à temperatura ambiente, com a superfície dos filmes exposta ao ar. Após obtenção da imagem da superfície do filme, a ponteira foi colocada sobre cada fibrila de fibroína observada e então as medidas de nanoindentação foram obtidas. Foi utilizada uma velocidade de 7,7 μ m/s e foram medidos 15 pontos em 3 regiões distintas de cada amostra. As medidas de indentação foram realizadas em 3 amostras diferentes, depositadas em lâminas de silício, com o objetivo de verificar a influência da presença de fibrilas alinhadas unidirecionalmente e bidirecionalmente nas propriedades mecânicas dos filmes. Foram analisados os seguintes filmes: 1) (PAH/SF)₂₀; 2) (CHI/SF)₂₀ e 3) (CHI/SF)_{10x10}, no qual 10 bicamadas foram depositadas e então o substrato foi girado em 90° e mais 10 bicamadas foram depositadas, obtendo-se fibrilas alinhadas em duas direções. Este procedimento para obtenção de filmes com fibrilas cruzadas foi proposto por Nogueira *et al.* (2010b).

5.1.4.5 Caracterização biológica

Para a caracterização biológica foram utilizados dois tipos de células em contato com os filmes LbL. A viabilidade celular foi analisada com fibroblastos do tipo NIH-3T3 enquanto a capacidade dos filmes de guiar o crescimento celular foi verificada com mioblastos C2C12. Inicialmente, os mioblastos C2C12 e os fibroblastos NIH-3T3 foram mantidos em sub-confluência em frascos de cultura em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 1% de antibióticos (25 U/mL penicilina e 25 µg/mL estreptomicina, Invitrogen). As células foram descoladas do fundo do frasco de cultura com tripsina-EDTA (Invitrogen).

A viabilidade celular quando em contato com os filmes multicamadas foi analisada no primeiro, terceiro e sétimo dia de cultura. Para isso, os filmes foram depositados em lâminas de vidro, contendo fibroína ou seu par catiônico no topo. As lâminas de vidro foram cortadas em pedaços de aproximadamente 25 mm x 10 mm, colocadas em placa de cultura de células de 6 poços e células de fibroblastos NIH-3T3 em uma densidade de 10.000 células/cm² de filme foram adicionadas no topo dos filmes. As células foram incubadas com DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, em incubadora com 5% CO₂, à 37°C. Para determinar a viabilidade celular, teste do tipo Live/Dead (Invitrogen) foi usado. Para isso os filmes foram retirados da cultura de células após um, três ou sete dias, e foram incubados com 200 µL de DMEM livre de soro contendo 1 µmol/L de calceína AM e 4 µmol/L de homodímero de etídio 1, por 45 minutos. A coloração foi então visualizada em microscópio de fluorescência invertido (Observer Z1, Zeiss), com uma lente objetiva de 10x, sendo que a coloração verde indica células vivas e a coloração vermelha indica células mortas. Os cálculos de viabilidade celular foram realizados através da contagem das células vivas e mortas presentes em 3 diferentes regiões da mesma amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata.

A habilidade do padrão imposto pelas fibrilas de fibroína presentes nos filmes em guiar a adesão e proliferação celular foi analisada utilizando-se células de mioblastos do tipo C2C12. Para isso, as células foram incubadas na superfície dos filmes com meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, em uma concentração de 13.000 células/cm² em placas de 6 poços. Os filmes contendo as células foram mantidos em incubadora com 5% CO₂, à 37°C e as células foram analisadas após 2, 4 e 7 dias de incubação. A adesão e proliferação celular foram observadas a partir de imagens feitas em microscópio de fluorescência

invertido (Observer Z1, Zeiss). Alternativamente, fibronectina em uma concentração de 20 µg/mL diluída em PBS foi adicionada na superfície dos filmes e incubada por 15 minutos, com o objetivo de aumentar a adesão celular. Quando atingida confluência, foi adicionado o meio de diferenciação, que consistia em DMEM contendo 2% de soro de cavalo e 1% de antibióticos. A utilização do meio de diferenciação faz com que as células dos mioblastos formem miotubos alongados, contendo múltiplos núcleos, precursores do tecido muscular.

5.2 Resultados e Discussão

Uma série de testes preliminares foi realizada a fim de determinar as melhores condições de deposição dos filmes, de maneira a se obter filmes uniformes e com fibrilas alinhadas.

Inicialmente foi realizado um estudo para verificar qual a melhor condição de pH para a deposição dos filmes com PAH. A compatibilidade entre a SF e a CHI em pH 6 e a SF e o PAH em diversos pHs foi verificada. Este teste é feito através da mistura das soluções poliméricas. Quando ocorre interação forte entre os polímeros, eles irão agregar e a mistura das soluções apresentará turbidez, indicando que os polímeros nestas condições serão bons pares poliméricos para a deposição no LbL. No teste de compatibilidade, nenhum dos pares apresentou turbidez (Figura 21), possivelmente devido à baixa concentração utilizada ou à fraca interação entre os polímeros estudados.

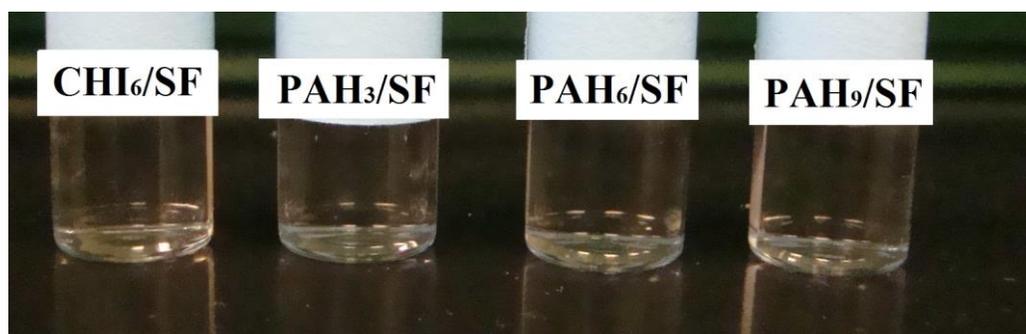


Figura 21: Teste de compatibilidade entre a fibroína e CHI pH 6 e fibroína e PAH pH 3, pH 6 e pH 9.

Apesar da baixa compatibilidade, foram construídos filmes com 20 bicamadas de PAH/SF em cada condição de pH. No pH 3, praticamente não foi observada a deposição de filme, sendo a espessura do filme seco de 26 nm. A fibroína gelifica em pH ácido, porém não foi observada a gelificação, nem a presença de aglomerados na solução de fibroína após a deposição com PAH em pH 3. Em pH 3, o PAH tem praticamente 80% de seus grupamentos amônio carregados (dado obtido por Espectroscopia de Foto-Elétrons de Raios-X) (Polak *et al.*, 2014), o que deveria favorecer a deposição por interações eletrostáticas. Em pH 6 e 9 foi observada a formação de um filme mais espesso, de 122 e 187 nm, respectivamente. A espessura do filme em pH 6 foi muito semelhante à espessura do filme depositado com CHI pH 6, em torno de 120 nm. Em pH 6, o

PAH tem ~ 60% de seus grupos amônio protonados, enquanto em pH 9 este número cai para 55% (dado obtido por Espectroscopia de Foto-Elétrons de Raios-X) (Polak *et al.*, 2014). O fato do filme não ser formado em pH 3, onde o PAH está mais protonado e somente ser formado em pH 6 e 9, com menor protonação, e a ausência de turbidez no teste de compatibilidade indicam que as interações eletrostáticas não são as únicas interações presentes na deposição de filmes com fibroína e provavelmente interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio têm papel importante na deposição, conforme observado por outros autores na literatura (Shchepelina *et al.*, 2011; Kozlovskaya *et al.*, 2012). Devido aos fatores acima relatados e ao fato da quitosana ser utilizada em pH 6, para fins de comparação, optou-se por utilizar o PAH também em pH 6 para os demais testes.

A fim de verificar a influência da etapa de secagem na formação dos filmes, dois testes diferentes foram realizados no sistema CHI/SF_{LiBr}. No primeiro foi realizado um processo de LbL completamente úmido. Para isso foram utilizadas as mesmas soluções e mesmas condições de deposição descritas na seção 5.1.3, porém sem a etapa de 5 minutos de secagem. No segundo, foi realizado um processo com secagem extra, com 10 minutos de secagem após a deposição de cada polímero e com fluxo de ar à 25°C. Como resultado (Figura 22), não foi formado filme no processo úmido e também não foram observadas fibrilas. Já no processo com secagem extra foi observada a formação de filme e a presença de fibrilas. Com isso, podemos concluir que a etapa de secagem é crucial para a estabilização da fibroína e formação do filme. Possivelmente a etapa de secagem é a responsável pela formação de uma estrutura estável folha-β, não sendo necessários pós-tratamentos nos filmes com solventes orgânicos, como o etanol por exemplo.

Com relação à influência do fluxo de ar na etapa de secagem na uniformidade dos filmes, foi observado que a utilização de fluxo de ar causa a formação de um filme menos uniforme, com a presença de diversos aglomerados de fibrilas no filme. Isto ocorre devido ao gradiente de concentração e instabilidade do sistema que é imposto pelo fluxo de ar. Por isso, optou-se por utilizar 5 minutos de secagem, porém à temperatura ambiente e sem fluxo de ar, o que permitiu o preparo de filmes mais uniformes e similares em cada batelada. Vale ressaltar que esta etapa atua como uma concentração gradual das soluções, não secando completamente o filme.

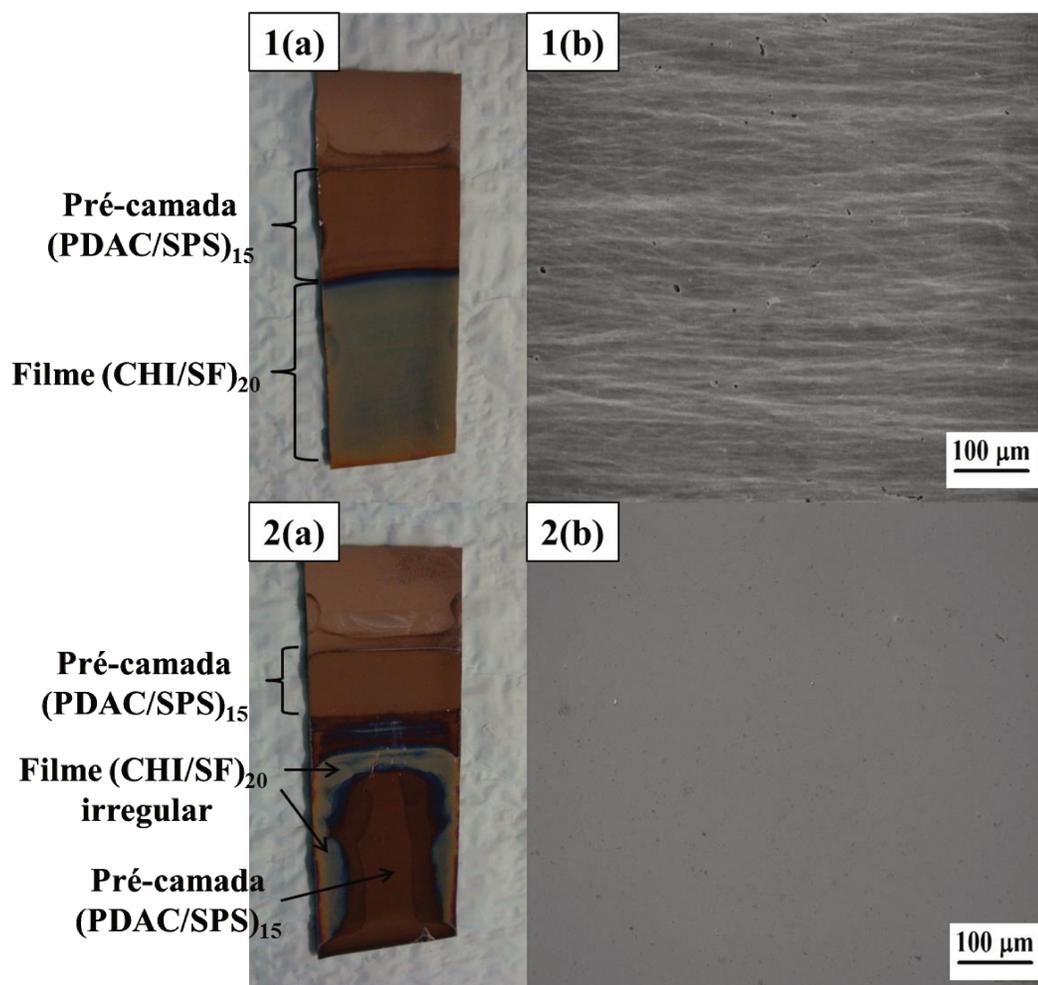


Figura 22: Fotografias (a) e micrografias (b) dos filmes depositados em lâmina de silício nas condições de secagem extra (1) e processo úmido (sem secagem) (2).

Para saber se a fibroína estava estável nos filmes multicamadas foi feito um teste imergindo o filme $(\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}})_{30}$ depositado em lâminas de vidro e silício em etanol. Sabe-se que a fibroína de seda pode ser estabilizada (transição da conformação de enovelamento aleatório para folha- β) através da imersão em etanol 70% por 20 min (Nogueira *et al.*, 2010a). Caso a fibroína já esteja presente em sua forma mais estável, a imersão em etanol não causará nenhuma alteração significativa em sua conformação ou mesmo na espessura do filme seco. Observando a Tabela 3, podemos verificar que o tratamento em etanol não causou alteração significativa da espessura dos filmes secos depositados em substrato de vidro ou de silício. Isto indica que a fibroína já está em sua forma estável ao ser imobilizada nas camadas nanométricas do filme, não sendo necessário fazer nenhum pós-tratamento para estabilizar o filme. Além disso, todos os

filmes LbL preparados nesta tese se mostraram altamente estáveis em água, com variação de espessura, quando secos, de menos de 1% após imersão em água ultrapura por sete dias.

Tabela 3: Espessura dos filmes secos (CHI/SF_{LiBr})₃₀ depositados por 10 minutos em substrato de vidro ou silício, antes e após tratamento por 20 minutos em etanol 70%.

	Espessura (nm)	
	Vidro	Silício
Antes EtOH	166,9 ± 21,2	168,3 ± 18,9
Após EtOH	163,3 ± 40,2	165,6 ± 34,7

Também foram feitos testes modificando o tratamento do substrato, o pH das soluções e o tipo de frasco utilizado. Após todos estes testes, verificou-se que os filmes eram formados de maneira mais uniforme e com menor variabilidade em cada batelada quando utilizadas as seguintes condições: a) substrato com pré-camada de (PDAC/SPS)₁₅; b) frasco de poliestireno, sendo utilizados apenas 2 lâminas por batelada, com a face polida do substrato de silício voltada para fora, de maneira a evitar a turbulência formada no interior do frasco ao imergir e retirar as lâminas; c) secagem parcial durante 5 minutos, à temperatura ambiente, sem fluxo de ar; d) fibroína diluída para 0,15 g/L, sem ajuste de pH (pH ~7,5); e) CHI 1 g/L, pH 6, ajustada com solução 5 mol/L de NaOH; f) PAH 1 g/L, pH 6, ajustado com solução 1 mol/L de NaOH.

5.2.1 Espessura e formação dos filmes

A Figura 23 apresenta a curva de crescimento dos filmes estudados. Dois tipos de soluções diferentes para dissolver a fibroína foram testadas para a formação dos filmes com a quitosana, enquanto com o PAH apenas a solução que utilizava brometo de lítio foi analisada. Estas soluções foram estudadas por serem as soluções mais utilizadas na dissolução da fibroína e por Nogueira *et al.* (2010b) ter sugerido que a formação de fibrilas de fibroína em filmes LbL com quitosana estaria ligada à uma dissolução insuficiente das fibras de fibroína na solução contendo LiBr, fazendo com que as fibrilas de fibroína estivessem presentes na solução e fossem apenas transferidas ao substrato durante a formação dos filmes.

Todos os filmes estudados ($\text{PAH/SF}_{\text{LiBr}}$, $\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$ e $\text{CHI/SF}_{\text{CaCl}_2}$) tiveram um crescimento linear entre 10 e 40 bicamadas. Os filmes depositados com PAH apresentaram maior espessura do que os filmes depositados com quitosana. Ainda, quando a fibroína foi dissolvida na solução contendo CaCl_2 os filmes se apresentaram ~18% mais espessos do que os filmes com fibroína dissolvida na solução contendo LiBr.

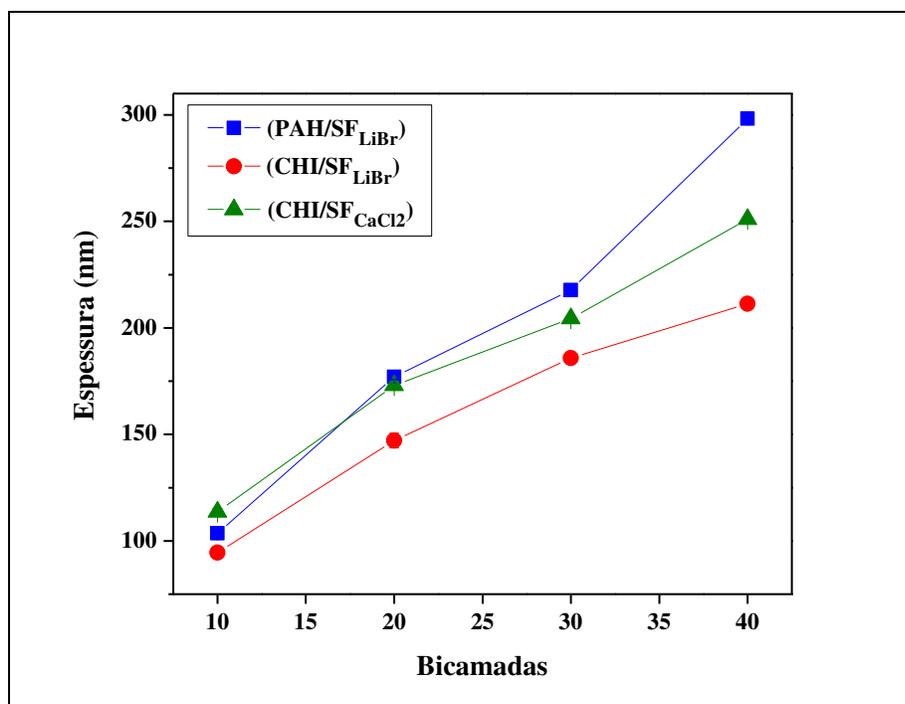


Figura 23: Curvas de crescimento dos filmes *layer-by-layer* com fibroína.

A Figura 24 mostra a fotografia dos filmes depositados em substratos de silício. Verifica-se um padrão de coloração em função da espessura dos filmes secos. Filmes com ~100 nm têm coloração azul forte (10BC), filmes com ~140 nm tem coloração azul clara, filmes com ~180 nm tem coloração amarelo prateada, filmes com ~210 nm tem coloração amarelo dourada e filmes com ~300 nm tem coloração azul forte com leve tom dourado. Este fenômeno é normalmente observado em filmes depositados em substratos de silício e chamado de *interference color*. Este fenômeno ocorre devido à luz incidente ser refletida nos limites superior e inferior do filme, formando uma nova onda. Esta onda depende da espessura e do índice de refração do filme, gerando assim o padrão de coloração observado.

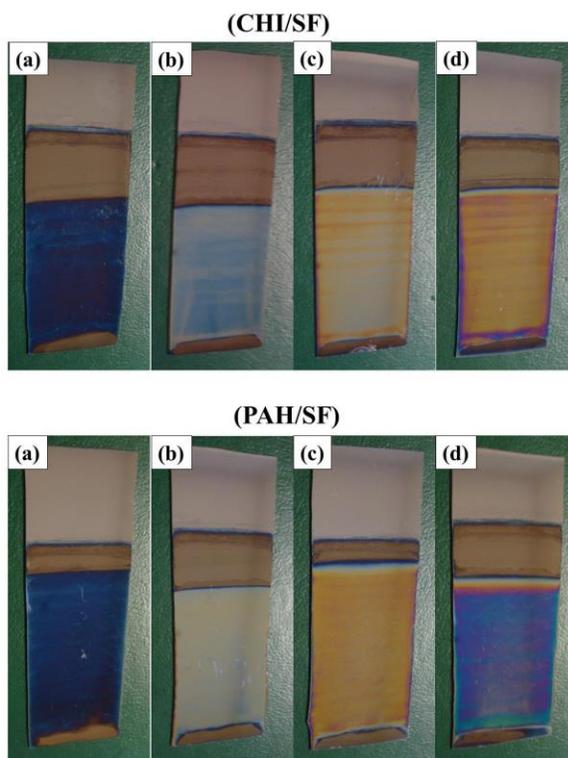


Figura 24: Fotografias dos filmes $\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$ e $\text{PAH/SF}_{\text{LiBr}}$ com 10 (a), 20 (b), 30 (c) e 40 (d) bicamadas.

A fim de poder correlacionar a espessura dos filmes secos (medida por elipsometria) com a espessura dos filmes úmidos (medida por QCM-D, mostrada a seguir) foram feitas análises de intumescimento dos filmes com 20 bicamadas. Os filmes $(\text{CHI/SF}_{\text{CaCl}_2})_{20}$ apresentaram maior grau de intumescimento (Figura 25), de $96 \pm 1\%$, enquanto os filmes $(\text{PAH/SF}_{\text{LiBr}})_{20}$ e $(\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}})_{20}$ tiveram intumescimento de $74 \pm 4\%$ e $78 \pm 3\%$, respectivamente. O elevado intumescimento apresentado pelos filmes está relacionado com a alta permeabilidade dos polímeros utilizados na construção dos filmes. Verifica-se que a fibroína é o principal determinante do intumescimento dos filmes, já que não foram observadas diferenças significativas quando utilizada quitosana ou PAH nos filmes com fibroína dissolvida na solução contendo brometo de lítio. Por outro lado, a solução utilizada para dissolver a fibroína apresenta papel central na determinação do intumescimento. Verificou-se um maior intumescimento quando utilizada a solução contendo cloreto de cálcio para dissolver a fibroína

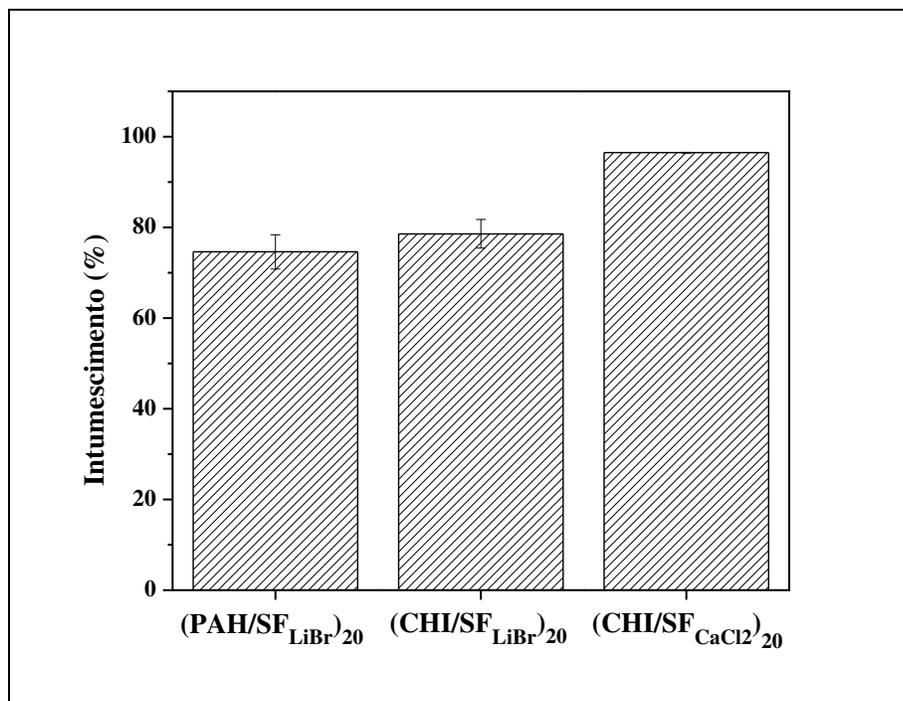


Figura 25: Intumescimento dos filmes estudados com 20 bicamadas.

As diferenças observadas na curva de crescimento e na capacidade de intumescimento dos diferentes filmes estudados indicam que a solução utilizada para dissolver a fibroína influencia fortemente sua capacidade de deposição em filmes finos. Um filme mais espesso e com maior intumescimento é obtido quando a fibroína é dissolvida com a solução contendo CaCl_2 , provavelmente devido à sua maior valência (Ca^{2+}) e remoção ineficiente do CaCl_2 durante a diálise. Mesmo utilizando o processo de diálise para remover os sais da solução, um estudo prévio realizado em nosso laboratório mostrou que pequenas quantidades de CaCl_2 permanecem na solução de fibroína após a diálise (Nogueira *et al.*, 2011). Esta quantidade de sal remanescente pode atuar aumentando a força iônica da solução de fibroína dialisada e os íons do sal podem acabar ‘blindando’ as cargas da fibroína, que irá assumir uma conformação mais enovelada e irregular, aumentando a espessura da camada depositada e permitindo uma maior permeação da água (fluido utilizado na análise de intumescimento).

A fim de se verificar a deposição *in situ* dos filmes contendo fibroína, foi realizada análise de QCM-D, na qual variações na frequência e dissipação do cristal de quartzo são associadas com ganho de massa, que por sua vez é correlacionado com a espessura do filme úmido. A Figura 26 mostra uma curva típica de QCM-D obtida para os filmes $\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$.

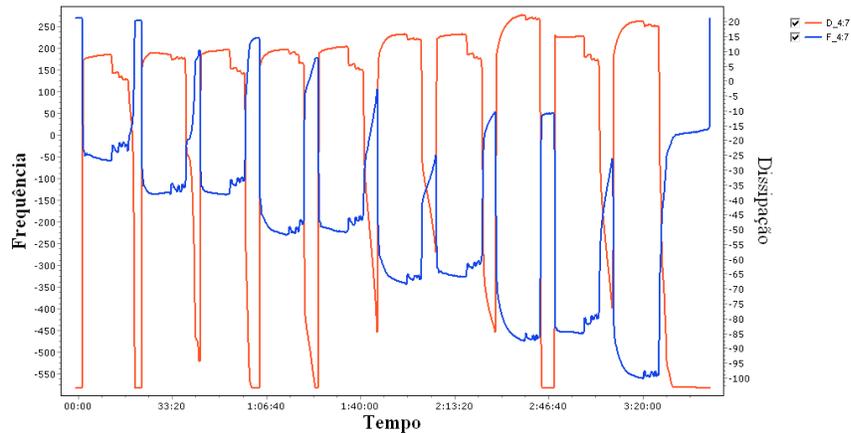


Figura 26: Curva típica obtida na análise de QCM-D para o filme CHI/SF_{LiBr}.

Devido às etapas de secagem após cada camada, necessárias para permitir a formação dos filmes com fibroína, foi necessário realizar uma série de modificações na modelagem, pois o *software* utilizado só considera a presença de fluidos no sistema e não é capaz de reconhecer o aumento da frequência induzido pela secagem como evaporação de água. Para isso, foi necessário diminuir os valores de frequência e dissipação obtidos utilizando apenas água sobre o cristal de todos os valores obtidos na análise, em cada overtone específico. Após isso foi feita a ocultação de todas as etapas de secagem realizadas na análise. A Figura 27 mostra as curvas de frequência e dissipação obtidas após modificação dos dados.

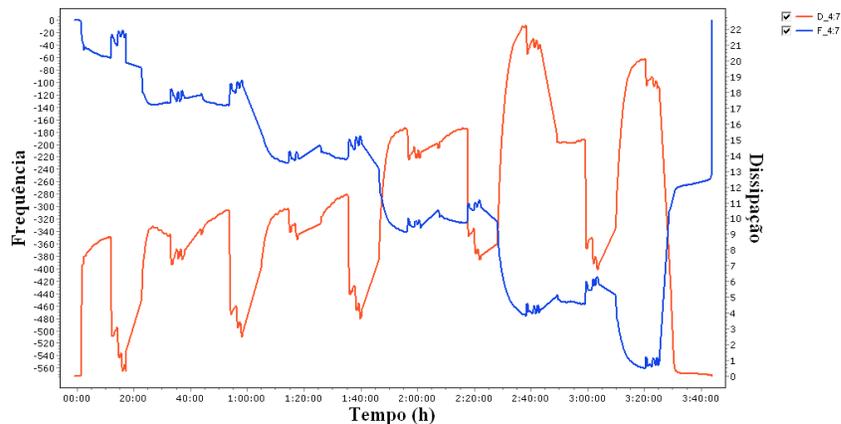


Figura 27: Curva típica obtida na análise de QCMD após ser subtraída frequência e dissipação da água e serem mascaradas as etapas de secagem.

A partir dos dados de frequência e dissipação mostrados na Figura 27 foi possível utilizar o modelo viscoelástico de Voigt para a modelagem dos dados e obtenção dos valores de espessura de cada camada no estado úmido. A Figura 28 mostra os valores de espessura de cada camada do filme úmido, obtidos após as etapas de lavagem dos diferentes filmes estudados. A análise de QCM-D também mostrou uma maior espessura para o filme preparado com SF_{CaCl_2} do que quando comparado aos filmes com SF_{LiBr} . Esta maior espessura do filme úmido (CHI/SF_{CaCl_2}) pode ser relacionada com o maior envelhecimento das moléculas de fibroína quando utilizada esta solução, conforme discutido anteriormente, e à maior capacidade de intumescimento deste filme (Figura 25).

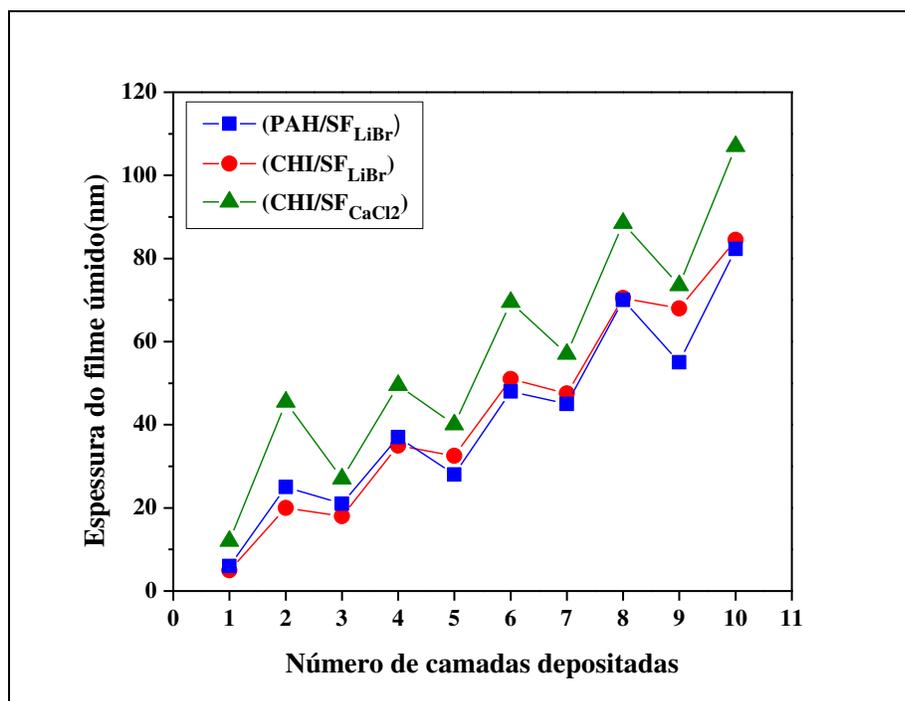


Figura 28: Espessura do filme úmido *versus* número de camadas depositadas obtidas por QCM-D para os diferentes filmes. As linhas conectando os pontos foram adicionadas à figura para maior clareza dos resultados. Números ímpares indicam a deposição do par catiônico (quitosana ou PAH) e números pares indicam a deposição de fibroína.

É observado no QCM-D uma diminuição na espessura dos filmes úmidos após cada adição de PAH ou quitosana, indicados pelos números ímpares de camada depositada. Esta

diminuição devido à adição do par catiônico pode estar associada a dois fenômenos distintos: 1) mudança de conformação da fibroína atribuída às etapas de secagem e 2) interpenetração entre as camadas poliméricas com consequente dessorção da fibroína.

Com relação à mudança de conformação da fibroína, deve-se considerar que as espessuras calculadas na análise de QCM-D se referem ao filme úmido, após as etapas de lavagem, porém antes da etapa de secagem realizada. Em solução, a fibroína apresenta conformação do tipo enovelamento aleatório, bastante enovelada, enquanto que após a secagem a fibroína é estabilizada, apresentando conformação folha- β (resultados mostrados no decorrer do capítulo, na seção 5.2.3), bastante organizada e compacta. Esta mudança conformacional também pode resultar em mudança na espessura do material depositado, ou seja, na forma úmida (analisada pelo QCM-D) a fibroína apresenta uma espessura maior do que na forma seca, quando sua estrutura será mais compacta.

A diminuição da espessura após a adição de quitosana também foi observada em filmes LbL de quitosana com ácido hialurônico (Richert *et al.*, 2004) e quitosana com mucina (Svensson *et al.*, 2006) e foi atribuída ao fenômeno de interpenetração entre as diferentes camadas do filme e dessorção dos polímeros. Quando a fibroína é depositada no substrato ela é adsorvida na superfície e também acaba difundindo entre as camadas vizinhas do filme, porém sem formar interações fortes. Com isso, quando as soluções de quitosana ou PAH são adicionadas elas formam uma camada na superfície do filme, porém também interagem e removem a fibroína que está fracamente adsorvida nas camadas internas do filme, ocorrendo a dessorção da fibroína das camadas vizinhas, o que justifica a diminuição na espessura do filme úmido quando estes polímeros são adicionados no filme.

Para analisar melhor a interpenetração entre as camadas nos filmes LbL com fibroína, foram feitas medidas de ângulo de contato nos filmes com 20 bicamadas (SF no topo) ou 20,5 bicamadas (quitosana ou PAH no topo).

Todos os filmes apresentaram ângulo de contato entre 71-81° (Tabela 4), que está de acordo com os valores encontrados na literatura para membranas de fibroína com conformação folha- β (Jin *et al.*, 2004). Não foi observada diferença significativa entre as diferentes amostras, o que indica que a molhabilidade destes filmes é similar e não muda em função do par catiônico ou do polímero depositado no topo. Esta similaridade no ângulo de contato com diferentes polímeros no topo é outra evidência da alta interpenetração entre as camadas de biopolímeros, que também

foi verificada pelo QCM-D. Ainda, os filmes apresentaram ângulo de contato similar quando depositados em silício ou vidro, indicando que o substrato não tem influência significativa na construção do filme.

Tabela 4: Medidas de ângulo de contato dos filmes *layer-by-layer* com fibroína depositados em lâminas de silício e de vidro.

	Silício	Vidro
Substrato	26,6 ± 0,1	29,1 ± 1,1
(CHI/SF _{LiBr}) ₂₀	77,6 ± 2,1	71,4 ± 5,9
(CHI/SF _{LiBr}) _{20,5}	76,2 ± 4,6	73,2 ± 3,4
(PAH/SF _{LiBr}) ₂₀	76,8 ± 1,5	77,7 ± 1,8
(PAH/SF _{LiBr}) _{20,5}	80,7 ± 6,2	81,9 ± 1,8

5.2.2 Caracterização morfológica

5.2.2.1 Influência da solução utilizada para dissolver a fibroína

Apesar das diferenças observadas com relação à espessura e intumescimento dos filmes preparados com a fibroína dissolvida em diferentes soluções, não foram observadas diferenças quanto à capacidade da fibroína formar fibrilas nos filmes LbL com quitosana (Figura 29), o que exclui a hipótese de que as fibrilas de fibroína são dependentes do tipo de solução utilizada em sua dissolução.

Devido ao fato da deposição de fibrilas de fibroína nos filmes LbL com quitosana não ser influenciada pelo tipo de solução utilizada para dissolver a fibroína, optou-se por dar sequência ao estudo somente com a fibroína dissolvida em LiBr:CH₃CH₂OH:H₂O, por ser a mesma solução utilizada nos estudos de Nogueira *et al.* (2009). Por isso, todos os próximos resultados se referem ao uso de fibroína dissolvida na solução contendo LiBr, com posterior diálise.

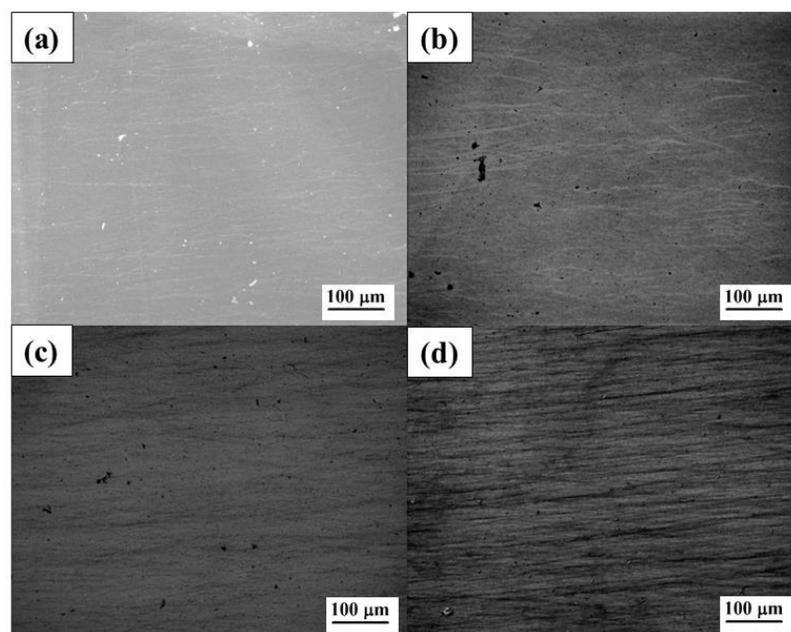


Figura 29: Imagens de microscopia óptica dos filmes (CHI/SF_{CaCl2}) com 10 (a), 20 (b), 30 (c) e 40 (d) bicamadas.

5.2.2.2 Influência do substrato e do par polimérico

A Figura 30 apresenta as imagens obtidas por microscopia óptica dos filmes (CHI/SF_{LiBr})₂₀ depositados em diferentes substratos. É possível observar a presença de fibrilas nos filmes com quitosana, independente do substrato utilizado. Foi possível observar a presença de fibrilas no substrato de silício, no qual se tem um bom contraste no microscópio óptico, que permite sua fácil visualização. Porém, quando utilizado substrato de vidro, não há contraste suficiente no microscópio para permitir a visualização das fibrilas. Por isso, foi necessário incubar o filme depositado em vidro em uma solução de rodamina, para corar as fibrilas, sendo possível a sua visualização também no substrato de vidro, conforme observado na Figura 30-1c.

Para melhor explorar a influência do substrato na deposição das fibrilas, foi utilizado um substrato hidrofóbico (ângulo de contato = $89^\circ \pm 3^\circ$) de ZnSe para depositar os filmes. Confirmando os resultados obtidos em silício e vidro, fibrilas de fibroína foram observadas nos filmes com quitosana depositados em ZnSe. O ângulo de contato para o filme (CHI/SF_{LiBr})₂₀ depositado em ZnSe foi de $74,7^\circ \pm 1,3^\circ$, dentro da faixa de valores obtidos para os filmes depositados em substratos hidrofílicos, como o vidro e silício, mostrados anteriormente na Tabela

4. Com isso pode-se concluir que o tipo de substrato não exerce influência significativa na deposição de fibrilas nos filmes ($\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$).

Por outro lado, não foi observada a deposição de fibrilas nos filmes com PAH, conforme observado na Figura 30-2. Isto indica que a deposição de fibrilas é altamente influenciada pelo par catiônico depositado no substrato e pouco influenciada pela hidrofobicidade/hidrofilicidade do substrato. É importante notar que os filmes ($\text{PAH/SF}_{\text{LiBr}}$) eram mais espessos que os filmes ($\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$), o que significa que a fibroína é depositada na forma de filme fino contínuo e não de fibrilas no sistema LbL com o PAH.

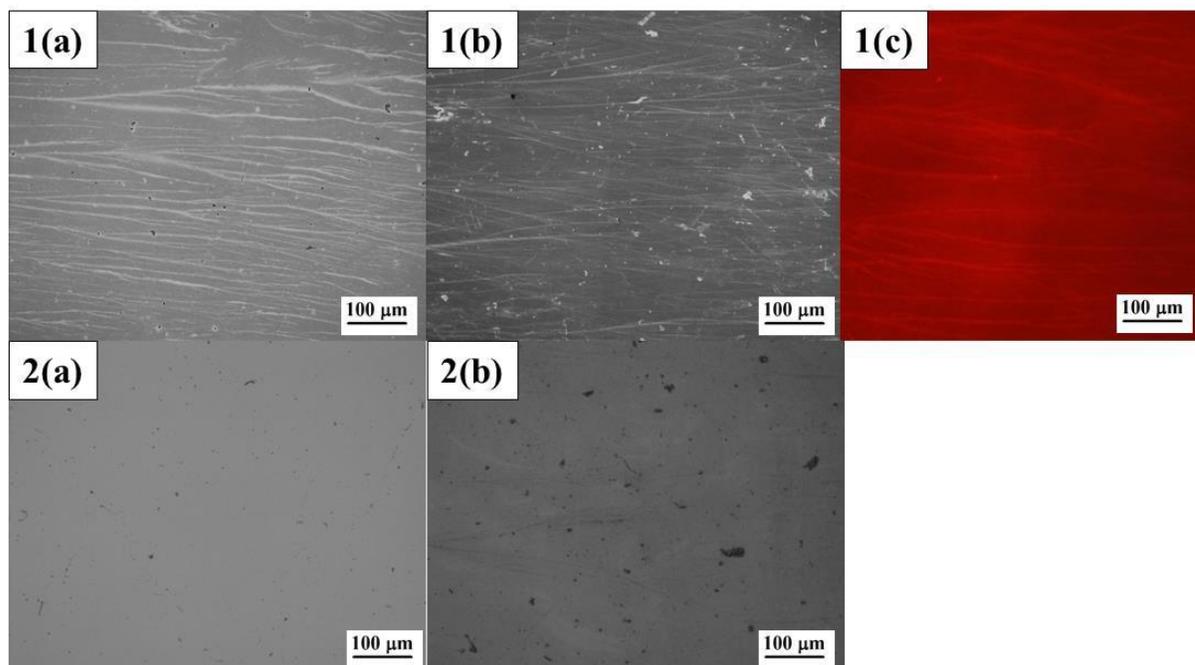


Figura 30: Imagens de microscopia óptica dos filmes ($\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$)₂₀ (1) e ($\text{PAH/SF}_{\text{LiBr}}$)₂₀ (2), depositados em substrato de silício (a), ZnSe (hidrofóbico) (b) e vidro (c).

Para confirmar a presença de fibrilas de fibroína no filme com quitosana, imagens de microscopia de força atômica foram obtidas para o filme ($\text{CHI/SF}_{\text{LiBr}}$)₂₀ (Figura 31). Pode-se observar a presença de um aglomerado de fibrilas, sendo que o filme apresentou rugosidade de 5,17 nm quando analisado em uma varredura de 2 μm x 2 μm , enquanto o filme ($\text{PAH/SF}_{\text{LiBr}}$)₂₀ apresentou uma superfície mais uniforme e menos rugosa (rugosidade = 1,96 nm), sem fibrilas. Através da imagem de AFM pode-se observar que as fibrilas estão presentes nas diversas

camadas do filme, em seu interior, resultando em uma elevação sutil na superfície. Além disso, a fibroína é depositada tanto na forma de fibrilas como na forma de filme contínuo.

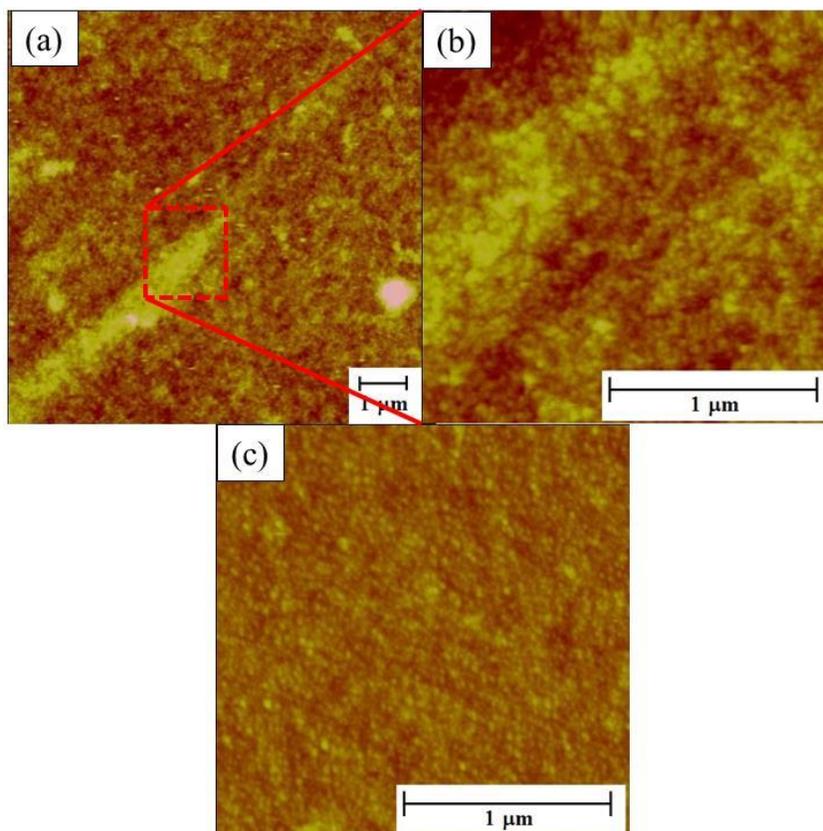


Figura 31: Microscopia de força atômica da superfície dos filmes no modo contato intermitente $(\text{CHI}/\text{SF}_{\text{LiBr}})_{20}$ (a,b) e $(\text{PAH}/\text{SF}_{\text{LiBr}})_{20}$ (c).

Para analisar a influência da quitosana na formação de fibrilas, foi construído um filme somente de fibroína, com 20 bicamadas. Foi possível observar a deposição de algumas fibrilas neste filme, conforme mostrado na Figura 32, porém a espessura do filme seco foi de somente 29 ± 6 nm. Com isso, podemos concluir que a quitosana não é a principal responsável pela formação das fibrilas, porém a presença de um par catiônico no sistema LbL com fibroína é essencial para o crescimento do filme.

A fibroína possui diversos aminoácidos em sua cadeia e possui um terminal amino e um terminal carboxila, podendo interagir tanto com polímeros catiônicos como aniônicos. O ponto isoelétrico da fibroína é de aproximadamente 4,2, portanto em soluções aquosas neutras, como é o caso da solução utilizada no desenvolvimento deste trabalho, a fibroína está negativamente

carregada (Lu *et al.*, 2012), o que favorece sua interação com polímeros catiônicos. Este fato foi confirmado através da construção de filmes LbL com SPS [Poli(4-estireno sulfonato de sódio)], nos quais o SPS atua como par aniônico, negativamente carregado, e um filme com somente 25 nm e sem deposição de fibrilas foi formado. Apesar das interações eletrostáticas atuarem na formação de filmes de fibroína, estas não são as únicas forças atuantes, sendo também muito relevantes as interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio.

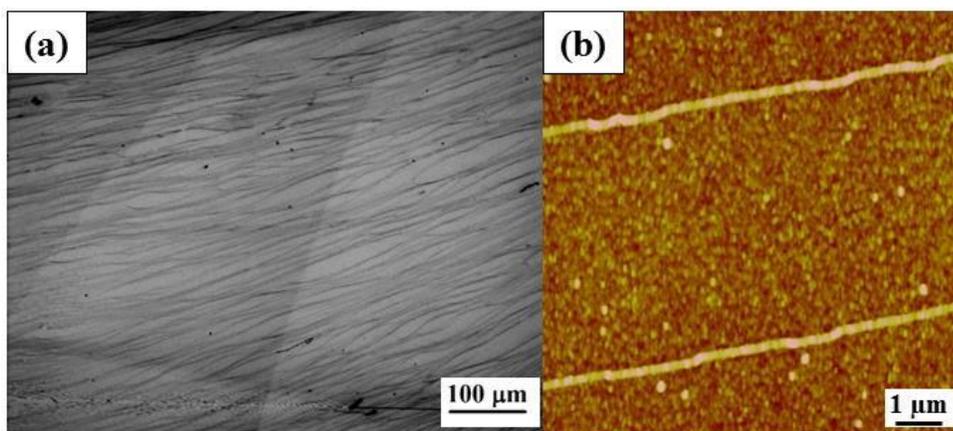


Figura 32: Filmes (SF/SF)₂₀ depositados em silício: imagem de microscopia óptica (a) e imagem de microscopia de força atômica no modo contato intermitente (b).

Imagens de microscopia de força atômica do filme (SF/SF)₂₀ confirmam a presença de fibrilas no filme. A melhor resolução obtida na imagem de AFM destas fibrilas deve-se ao fato de na Figura 32 as fibrilas estarem presentes como uma monocamada, completamente disponíveis na superfície, enquanto na Figura 31 as fibrilas estão presentes nas camadas internas do filme, o que dificulta seu mapeamento já que a microscopia de força atômica é uma técnica que avalia apenas a superfície. Estas fibrilas são similares às obtidas por *spin-coating* de solução de fibroína extraída das glândulas do bicho-da-seda em substrato de mica (Figura 33), relatadas por Greving *et al.* (2012). Porém, estes autores afirmaram que as fibrilas de fibroína só eram formadas devido ao cisalhamento imposto pelo *spin-coating*, uma vez que eles não observaram fibrilas quando a fibroína foi incubada em mica sem cisalhamento.

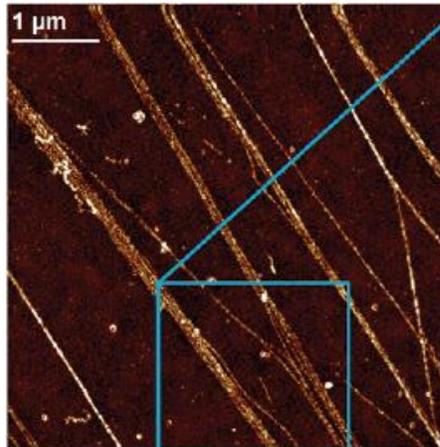


Figura 33: Imagem de AFM mostrando fibrilas de fibroína de seda obtidas por *spin-coating* por Greving *et al.* (2012).

Por outro lado, Lu *et al.* (2012) sugerem que as fibrilas de fibroína (chamadas nanofilamentos) são formadas em solução, pela combinação de fatores como concentração da solução, carga das moléculas, mobilidade molecular e interações hidrofóbicas/hidrofílicas. A auto-organização da fibroína em nanoestruturas foi atribuída não somente a um processo termodinâmico, com estrutura estável seda II, mas também a um processo cinético, influenciado pelo conjunto de parâmetros citado acima. Conforme explicado na parte introdutória deste capítulo, estes autores consideram que as moléculas de fibroína quando em solução aquosa formam agregados coloidais por agirem como polímeros hidrofílicos-hidrofóbicos-hidrofílicos, formando então estruturas esféricas em água, conforme mostrado anteriormente na Figura 2 (Lu *et al.*, 2012). A formação dos agregados coloidais ocorre devido às interações hidrofóbicas entre os blocos hidrofóbicos da cadeia e à repulsão eletrostática dos grandes blocos hidrofílicos (negativamente carregados), localizados nas extremidades da cadeia da fibroína (Chen *et al.*, 2008). Estes agregados coloidais podem se unir formando nanofibrilas em função de parâmetros como a concentração da solução de fibroína e a carga eletrostática (Lu *et al.*, 2012), que podem ser explicados baseando-se na teoria DLVO.

A teoria DLVO propõe que as energias de interação que influenciam a agregação de duas partículas da mesma natureza são as forças de van der Waals e as forças entre as duplas camadas elétricas das partículas. As forças de van der Waals, para duas partículas de mesma natureza, serão sempre atrativas. Já as forças entre as duplas camadas elétricas, para partículas com cargas superficiais idênticas, serão repulsivas (Israelachvili, 1992). Ambas as forças dependem da

distância interpartículas e a força total resultante irá determinar se as partículas irão agregar ou não (Figura 34). À medida que as partículas se aproximam umas das outras, as forças atrativas de curto alcance de van der Waals induzem à agregação do sistema.

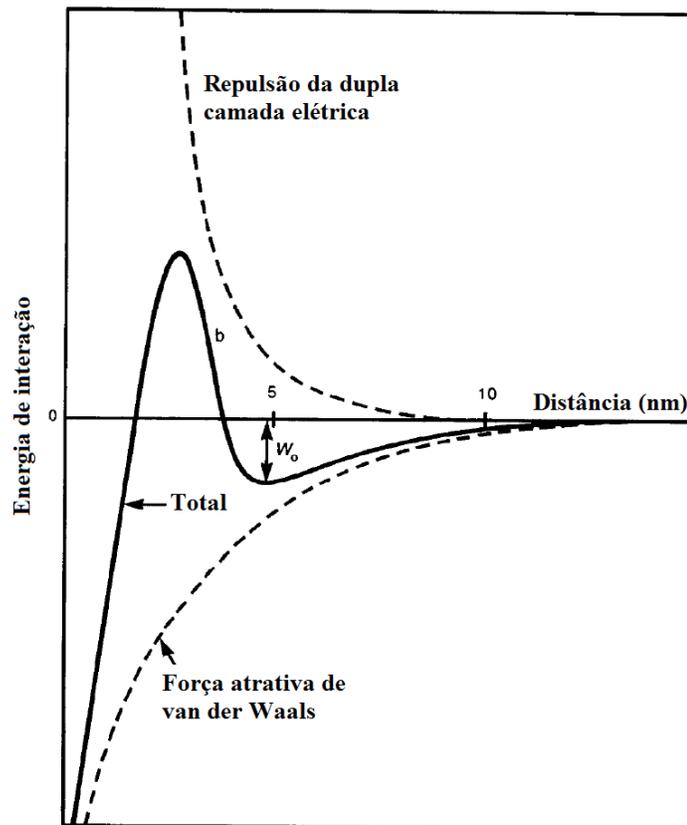


Figura 34: Energia total de interação entre duas partículas, conforme teoria DLVO. Adaptado de Israelachvili (1992).

A teoria de DLVO é baseada nas forças de atração e repulsão de duas partículas e não considera a concentração do sistema. Porém, podemos considerar que, em soluções mais concentradas, a probabilidade de aproximação entre as partículas será maior e, portanto, o aumento na concentração irá acelerar a agregação do sistema. Para o caso dos agregados coloidais de fibroína, Lu *et al.* (2012) propõem que, em soluções aquosas concentradas de fibroína (pH neutro), a fim de reduzir as forças repulsivas, visto que os agregados coloidais têm carga líquida negativa em suas superfícies ($pK = 4,2$), a formação de fibrilas a partir dos agregados coloidais é a organização preferível, uma vez que um agregado sofrerá a força repulsiva de apenas mais um ou dois agregados durante a formação da fibrila, já no caso de formação de um glóbulo, o

agregado sofrerá uma grande repulsão. Este modelo explicaria a tendência da fibroína em formar nanofibrilas compostas por agregados coloidais e não grandes aglomerados de agregados.

Fazendo um paralelo entre o modelo de formação de fibrilas proposto por Lu *et al.* (2012) com os sistemas LbL estudados nesta tese, pode-se formular algumas hipóteses a respeito da formação de fibrilas de fibroína nos filmes ultrafinos. Considerando que foi utilizada a mesma solução de fibroína tanto para os filmes com quitosana como para os filmes com PAH e que as fibrilas somente foram observadas no sistema com quitosana, pode-se concluir que a carga eletrostática apresentada por estes polímeros irá exercer grande influência na presença ou não das fibrilas. Sabe-se que o PAH está protonado nas condições deste estudo, e que ele possui maior densidade de cargas positivas do que a quitosana. Isto indica que a presença de PAH com grande densidade de cargas positivas estabiliza os agregados coloidais de fibroína, mantendo-os bem dispersos, formando um filme contínuo. Por outro lado, a CHI possui menor densidade de cargas que o PAH e em pH 6 está com poucos grupos protonados, que não são suficientes para estabilizar os agregados coloidais. Durante a etapa de secagem da fibroína esta vai sendo concentrada, a probabilidade de aproximação dos agregados coloidais atingindo a distância crítica de agregação (na qual as forças atrativas de van der Waals terão maior influência do que a repulsão entre as cargas) aumenta e os agregados coloidais então se organizam na forma de fibrilas (energeticamente favorável), conforme proposto por Lu *et al.* (2012). A influência da concentração na transição morfológica de também é observada em dipeptídeos (Yan, Zhu e Li, 2010). Em soluções diluídas, as moléculas de dipeptídeos são capazes de se auto-organizar na forma de esferas de aproximadamente 400 nm em diâmetro, enquanto em soluções concentradas estas esferas se alinham, formando estruturas tubulares, através de interações intermoleculares.

Contrariamente ao proposto por Lu *et al.* (2012) que propõem a formação de fibrilas de fibroína a partir do alinhamento de agregados coloidais, alguns autores afirmam que as fibrilas de fibroína são formadas quando ocorre uma transição da estrutura amorfa da fibroína para uma estrutura organizada folha- β (Chen *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2009). Neste caso, o estiramento dos blocos hidrofóbicos presentes no interior nos agregados coloidais de fibroína induzido pela formação da estrutura folha- β seria o responsável pela formação das nanofibrilas e consequente transição morfológica de agregados coloidais para nanofibrilas (Chen *et al.*, 2008).

Com relação à influência do par polimérico na formação de fibrilas, podemos citar o estudo de Lee *et al.* (2013) em fibrilas de caseína em filmes LbL de caseína com ácido poli(acrílico) (PAA) e caseína com ácido poli(4-estireno sulfônico) (PSS). Os autores verificaram a formação de fibrilas de caseína após indução por tratamento térmico nos filmes caseína/PAA. Porém, não foram verificadas fibrilas mesmo com a indução pelo tratamento térmico nos filmes caseína/PSS. Os autores atribuíram este resultado ao fato de a caseína estar fortemente ligada ao PSS nos filmes LbL, impedindo a formação das fibrilas. Foi concluído que a caseína só forma fibrilas em filmes LbL quando as ligações de hidrogênio entre as folhas- β da caseína são mais fortes que as ligações intermoleculares entre a caseína e o PAA ou PSS, indicando que o processo de fibrilação nos filmes LbL é competitivo.

O mesmo foi observado nesta tese, onde foi possível verificar que nos filmes nos quais a fibroína era capaz de formar mais interações eletrostáticas (PAH) não foram verificadas fibrilas. Porém, nos filmes com menor capacidade de formação de interações eletrostáticas (CHI), as fibrilas foram observadas, possivelmente pelo fato das interações fibroína-fibroína serem mais fortes que as interações eletrostáticas entre a fibroína e a quitosana, favorecendo a formação das fibrilas.

Os resultados obtidos nesta tese fornecem uma maior compreensão a respeito da formação de fibrilas de fibroína em filmes LbL. Pode-se concluir até o momento que a força de interação com o par polimérico irá definir a formação ou não das fibrilas, sendo as mesmas formadas quando a interação com o par polimérico é fraca. Com relação a estrutura das fibrilas não se pode afirmar se as mesmas são formadas pelo alinhamento de agregados coloidais ou pelo estiramento das moléculas de fibroína durante a formação de estrutura folha- β .

5.2.3 Caracterização química

A conformação da fibroína pode ser verificada através de espectroscopia de infravermelho (FTIR) onde dependendo do comprimento de onda em que se encontram os picos referentes às bandas de amida I, II e III da fibroína pode-se determinar sua conformação. Bandas de amida I, II e III localizadas em 1660, 1540 e 1230 cm^{-1} , respectivamente, são associadas com a estrutura do tipo seda I (enovelamento aleatório ou hélice- α), enquanto a estrutura seda II (folha- β) apresenta bandas de amida I, II e III em 1630, 1515 e 1260 cm^{-1} , respectivamente (Rusa *et al.*, 2005). As

bandas de amida I, II e III são atribuídas ao estiramento C=O, à deformação N-H e ao dobramento O-C-N, respectivamente (Rusa *et al.*, 2005; Weska, 2009).

A Figura 35 apresenta os espectros de FTIR obtidos para os filmes (CHI/SF)₂₀ e (PAH/SF)₂₀ depositados em cristais de ZnSe e analisados em modo de transmissão. A Tabela 5 apresenta os valores de número de onda das bandas apresentadas, bem como sua atribuição.

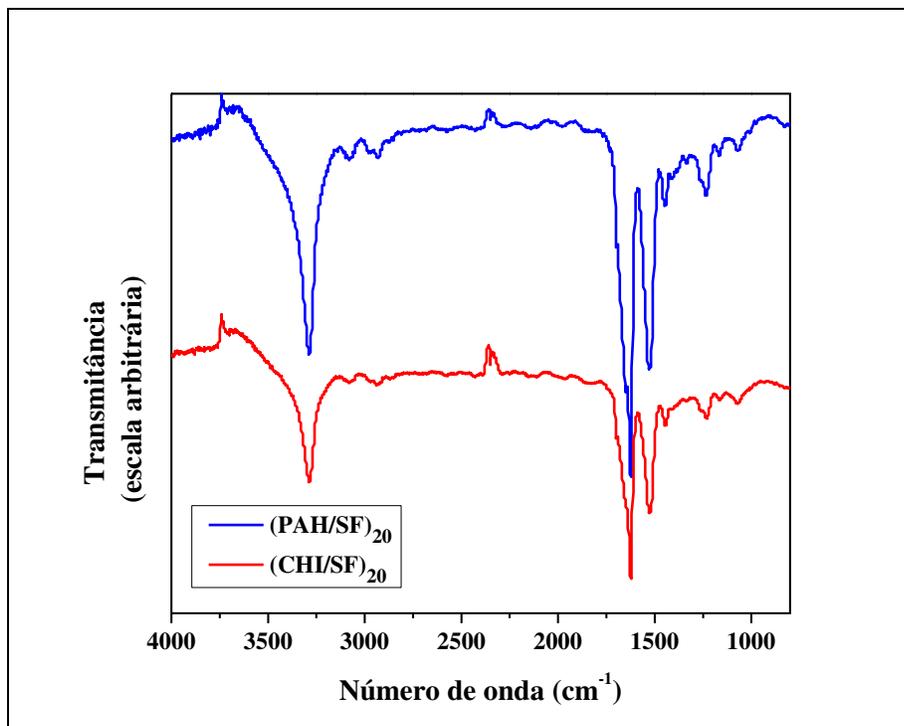


Figura 35: Espectro de FTIR dos filmes (PAH/SF)₂₀ e (CHI/SF)₂₀ depositados em substrato de ZnSe.

Foram obtidos exatamente os mesmos espectros de FTIR para os filmes depositados com quitosana ou PAH. Desta forma, não foram identificadas alterações quanto à conformação da fibroína ou presença de grupos funcionais com a variação do par polimérico. A fibroína de seda apresentou banda de amida I e II em 1620 e 1530 cm⁻¹, respectivamente, referentes à conformação seda II. Já a banda de amida III apresentou conformação seda I, com comprimento de onda em 1230 cm⁻¹ (Um *et al.*, 2001; Qiang *et al.*, 2004). Com isso, pode-se dizer que há coexistência das conformações seda I e seda II da fibroína, com predominância de conformação estável do tipo folha-β. Além disso, a fibroína está imobilizada nas camadas nanométricas dos

filmes, não sofrendo alterações quando exposta a fatores externos, como foi verificado na Tabela 3, quando os filmes foram imersos em água e etanol 70% e não foi verificada alteração significativa na espessura destes filmes, confirmando a presença de uma conformação estável do tipo folha- β .

Tabela 5: Principais bandas observadas na análise de FTIR nos filmes (PAH/SF)₂₀ e (CHI/SF)₂₀ depositados em cristal de ZnSe.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
(PAH/SF) ₂₀	(CHI/SF) ₂₀	
3290	3290	Ligação de H intermolecular
1620	1620	Amida I
1530	1530	Amida II
1450	1450	Ligação O-H
1230	1230	Amida III
1070	1070	Estiramento O-H

Análises de dicroísmo circular foram realizadas na solução de fibroína dialisada e também nos filmes depositados com quitosana ou PAH (Figura 36) de maneira a complementar os resultados de conformação molecular da fibroína obtidos por FTIR. A solução de fibroína após a diálise apresentou espectro típico de conformação enovelamento aleatório (Li *et al.*, 2001). Já os filmes (CHI/SF)₂₀ e (PAH/SF)₂₀ apresentaram espectros típicos de conformação folha- β , com banda de elipticidade negativa em 213 nm. Este resultado está de acordo com os resultados de FTIR e com a hipótese de que a etapa de secagem e o confinamento das moléculas de fibroína em filmes ultrafinos (escala nanométrica) resultam em uma estrutura estável.

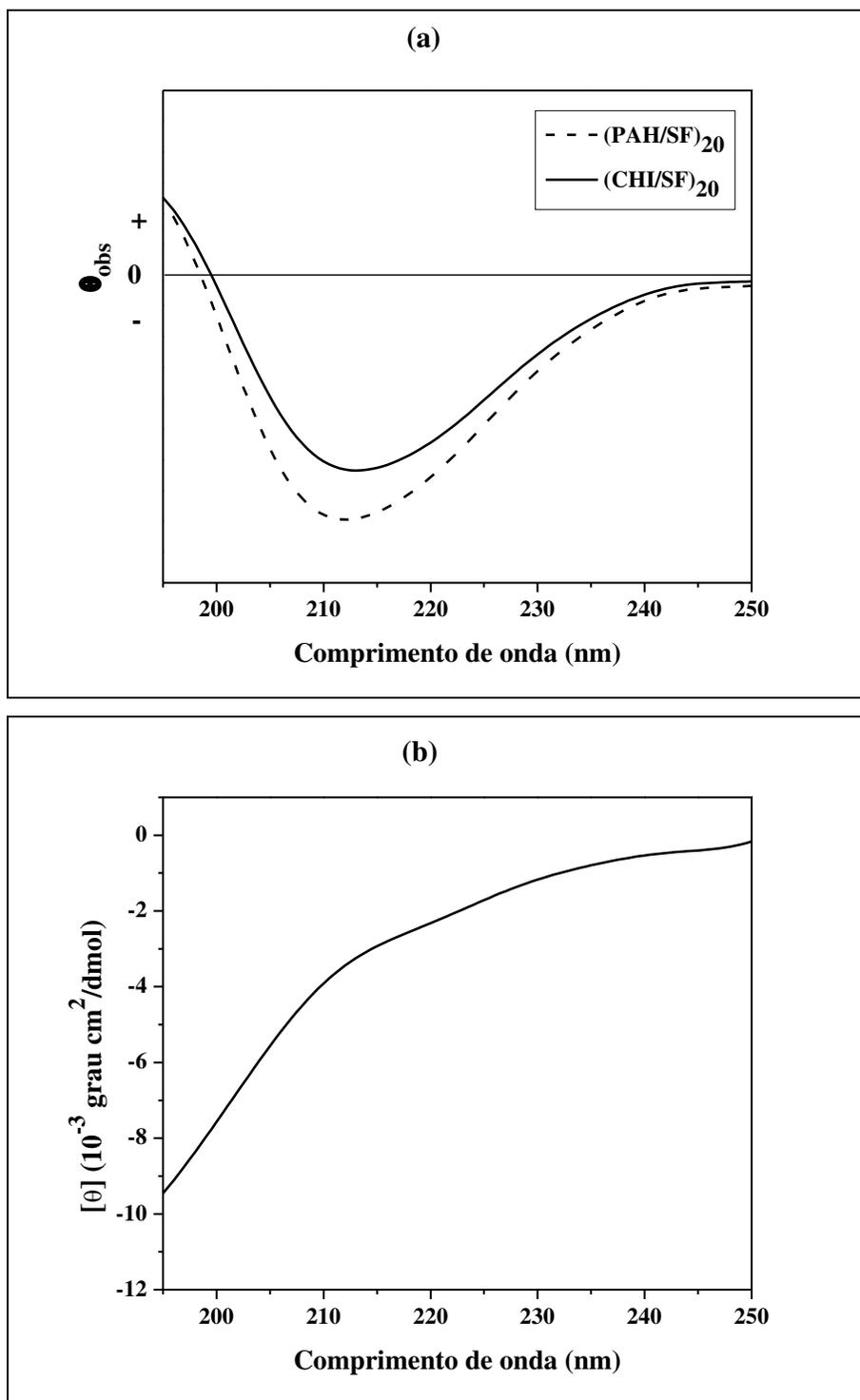


Figura 36: Espectro de dicroísmo circular dos filmes (PAH/SF)₂₀ e (CHI/SF)₂₀ depositados em lâminas de quartzo (a) e da solução de fibroína 0,15 g/L (b).

5.2.4 Caracterização mecânica

A resistência mecânica dos filmes ultrafinos multicamadas foi verificada por nanoindentação em AFM. As curvas de carga-descarga obtidas pela nanoindentação podem fornecer uma ideia inicial das características do filme e da irreversibilidade do processo. Pelo perfil apresentado na Figura 37 verifica-se que todos os filmes apresentaram comportamento típico de materiais elasto-plásticos (Menčík, 2012). Isto ocorre em sistemas nos quais, após retirada a carga, o material não retorna à sua forma original devido às deformações plásticas sofridas durante o processo de carga. Porém, devido à relaxação das moléculas, ocorre recuperação parcial do material, pela ação das tensões elásticas.

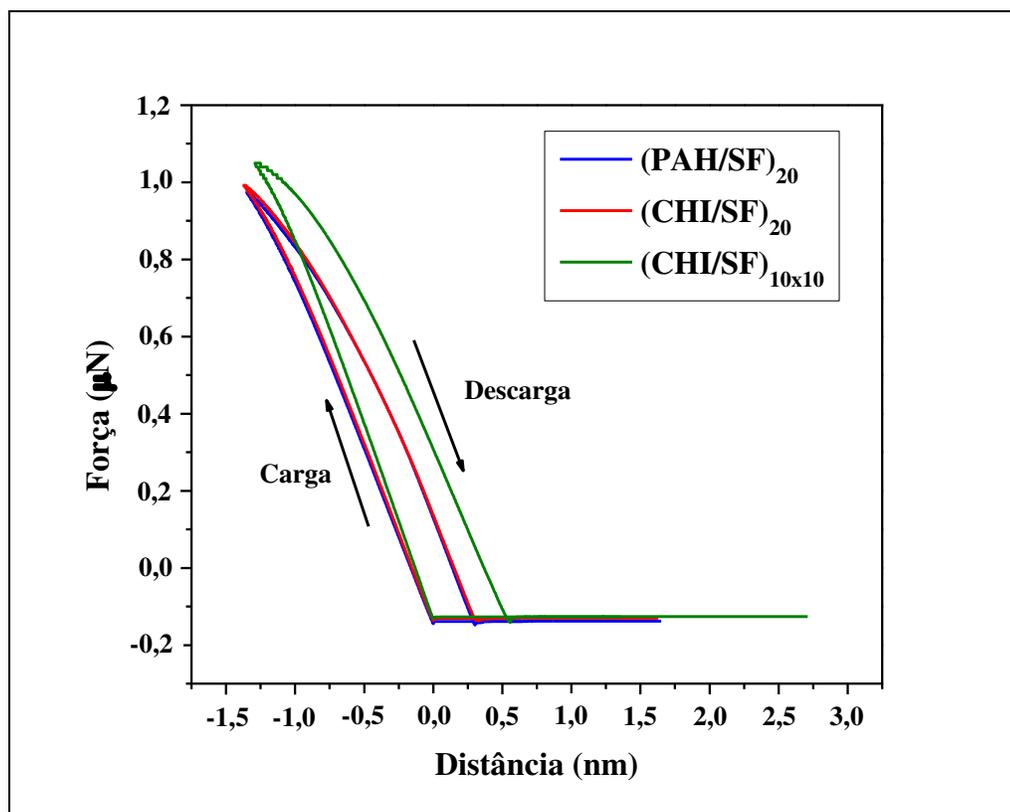


Figura 37: Curvas típicas de força-distância obtidas por nanoindentação em AFM dos filmes estudados.

Verificou-se que os filmes (PAH/SF)₂₀ e (CHI/SF)₂₀ apresentaram comportamento muito semelhante, não sendo observadas diferenças significativas em todas as curvas analisadas. Já para o filme contendo fibrilas cruzadas (CHI/SF)_{10x10} foi observada maior resistência à penetração da ponteira quando comparado com os demais filmes. Pode-se verificar que, para penetrar uma mesma distância do filme, é necessário aplicar maior força no filme com fibrilas cruzadas (CHI/SF)_{10x10} do que nos filmes (PAH/SF)₂₀ e (CHI/SF)₂₀.

Estes resultados indicam que a presença de fibrilas alinhadas unidirecionalmente nos filmes LbL não é capaz de fornecer uma maior resistência mecânica a estes filmes. No entanto, quando estas fibrilas estão alinhadas bidirecionalmente, de forma cruzada (90°) nos filmes, observa-se maior resistência dos mesmos.

5.2.5 Caracterização biológica

A compatibilidade dos filmes com fibroblastos do tipo NIH-3T3 foi investigada (Figura 38). A viabilidade celular quando em contato com os filmes permaneceu em torno de 90-100% durante os 7 dias de incubação. A compatibilidade dos filmes não foi influenciada pelo polímero presente no topo (última camada), uma vez que resultados similares foram obtidos quando utilizado CHI, PAH ou SF como última camada, entrando em contato direto com as células. Este resultado está provavelmente relacionado à elevada interpenetração entre as camadas, observada por QCM-D, formando um material final com propriedades similares, sem ser influenciado pelo polímero presente na última camada. Este primeiro teste de biocompatibilidade dos filmes multicamadas com fibroína indica que os filmes são promissores para uso em biomateriais, não sendo tóxicos às células.

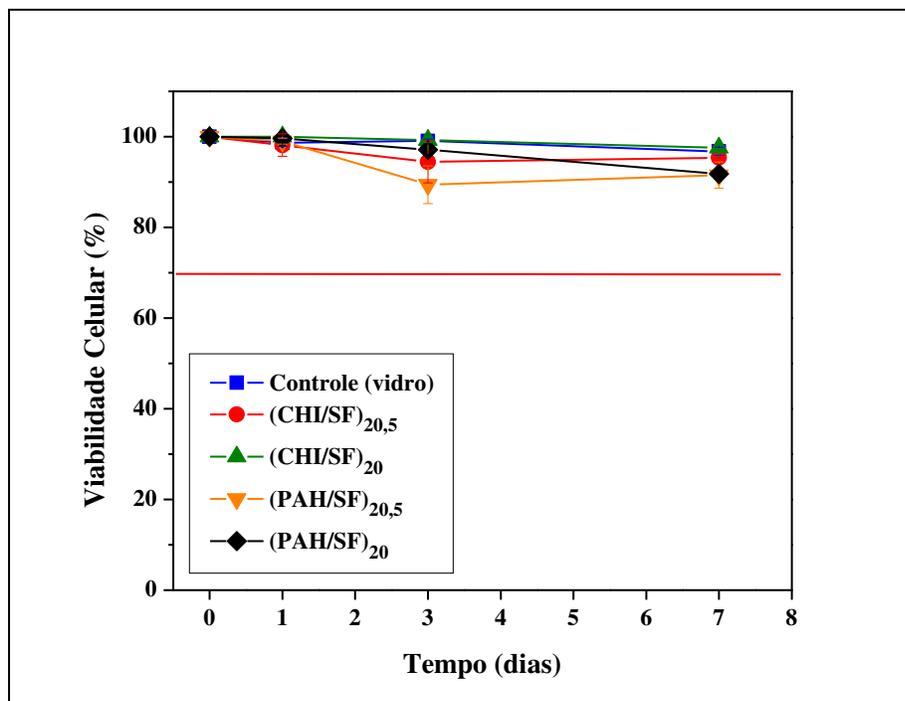


Figura 38: Teste de viabilidade celular para os filmes (CHI/SF) e (PAH/SF).

A fim de verificar se o padrão de fibrilas de fibroína presente nos filmes LbL seria capaz de guiar a adesão e crescimento celular, foram feitos testes utilizando células de mioblastos do tipo C2C12. A Figura 39 mostra as imagens de microscopia de fluorescência após 2, 4 e 7 dias de incubação das células sobre os filmes.

Verificou-se que as células apresentaram uma baixa adesão aos filmes e não foram capazes de se alinhar conforme o padrão de fibrilas imposto pelos filmes. As células atingiram confluência após sete dias de cultura nos filmes (CHI/SF)₂₀, (CHI/SF)_{20,5} e (PAH/SF)_{20,5}. Nestes filmes foi dado prosseguimento ao teste, porém as células acabaram descolando dos filmes. Ainda, observou-se que o controle (vidro) atingiu confluência antes do sétimo dia de cultura, porém quando observado no sétimo dia de cultura as células já haviam descolado. Isto indica que as células atingiram confluência mais rapidamente no controle e que os filmes LbL acabaram diminuindo a velocidade da proliferação celular. Ainda, depois de atingida confluência as células descolaram dos filmes, indicando baixa adesão celular.

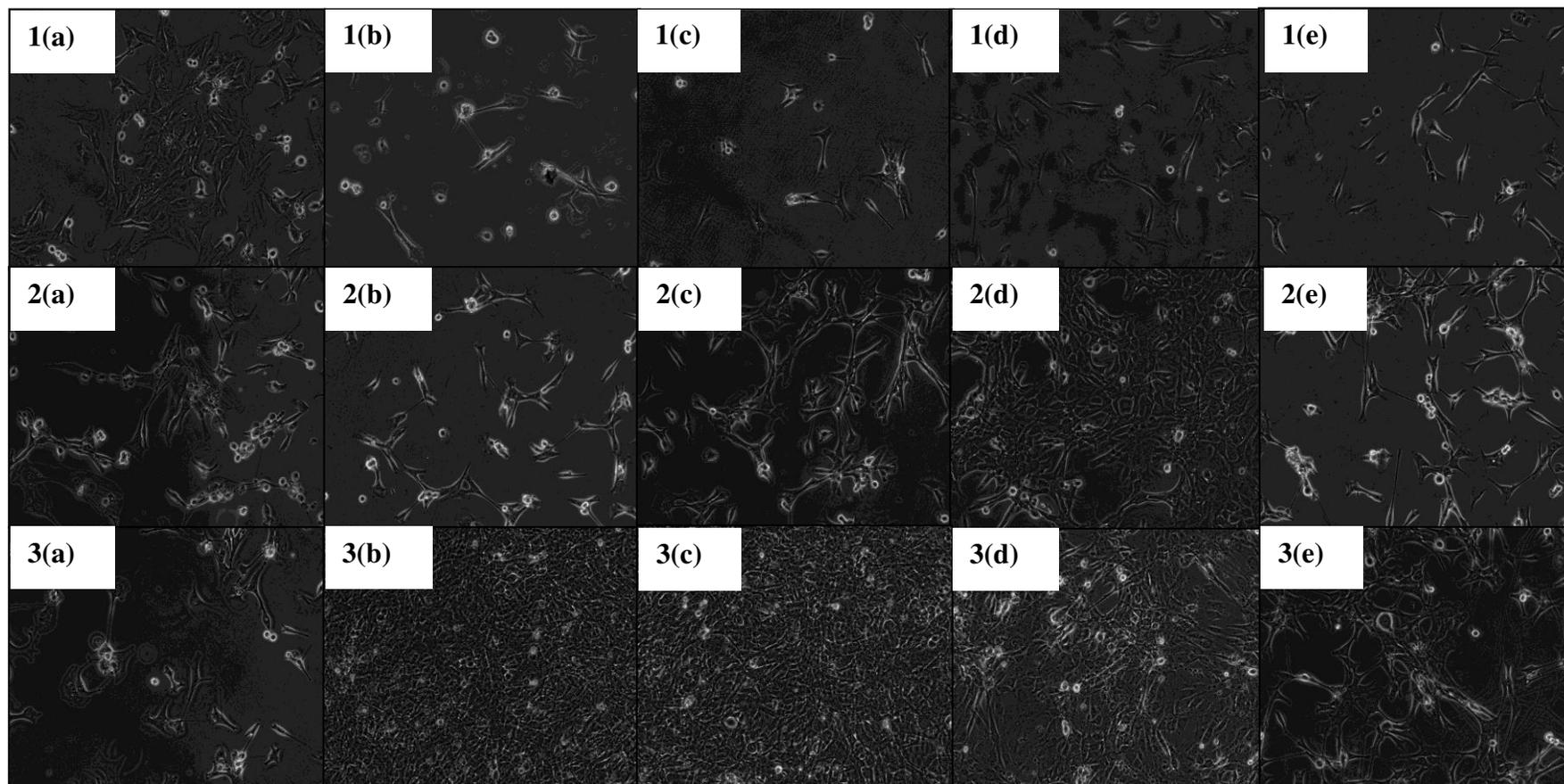


Figura 39: Imagens de microscopia de fluorescência da adesão e proliferação de células de mioblastos C2C12 incubadas no controle de vidro (a) e nos filmes *layer-by-layer* (CHI/SF)_{20,5} (b), (CHI/SF)₂₀ (c), (PAH/SF)_{20,5} (d) e (PAH/SF)₂₀ (e), no segundo (1), quarto (2) e sétimo (3) dia de cultura.

A fim de aumentar a adesão celular optou-se por adicionar algumas gotas de fibronectina na superfície dos filmes, antes da incubação com os mioblastos. A Figura 41 mostra os resultados obtidos. É possível observar que a adesão celular foi aumentada significativamente ao adicionar fibronectina na superfície dos filmes. As células aderiram e proliferaram bem, atingindo confluência após 4 dias de incubação, quando então foi adicionado o meio de diferenciação utilizado para mioblastos. Apesar de atingirem confluência no quarto dia de incubação, não foi verificado um padrão de alinhamento celular que pudesse estar seguindo o alinhamento das fibrilas de fibroína. No sétimo dia de incubação (3 dias no meio de diferenciação) verificou-se que as células descolaram dos filmes, formando uma espécie de tecido no meio de cultura e não na superfície do filme. Se a adesão é pouco favorecida, as interações célula-célula acabam se tornando mais fortes do que as interações célula-superfície, fazendo com que ocorra a formação de um ‘tecido’ de células que inicia no filme e vai descolando, atingindo o meio de cultura. A Figura 40 mostra uma imagem de microscopia de fluorescência típica do início do descolamento das células, observado nos testes.

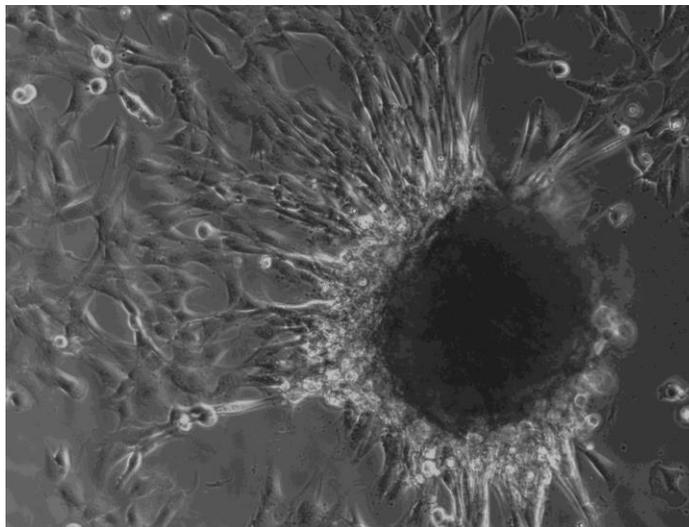


Figura 40: Imagem de microscopia de fluorescência do início do descolamento das células dos filmes.

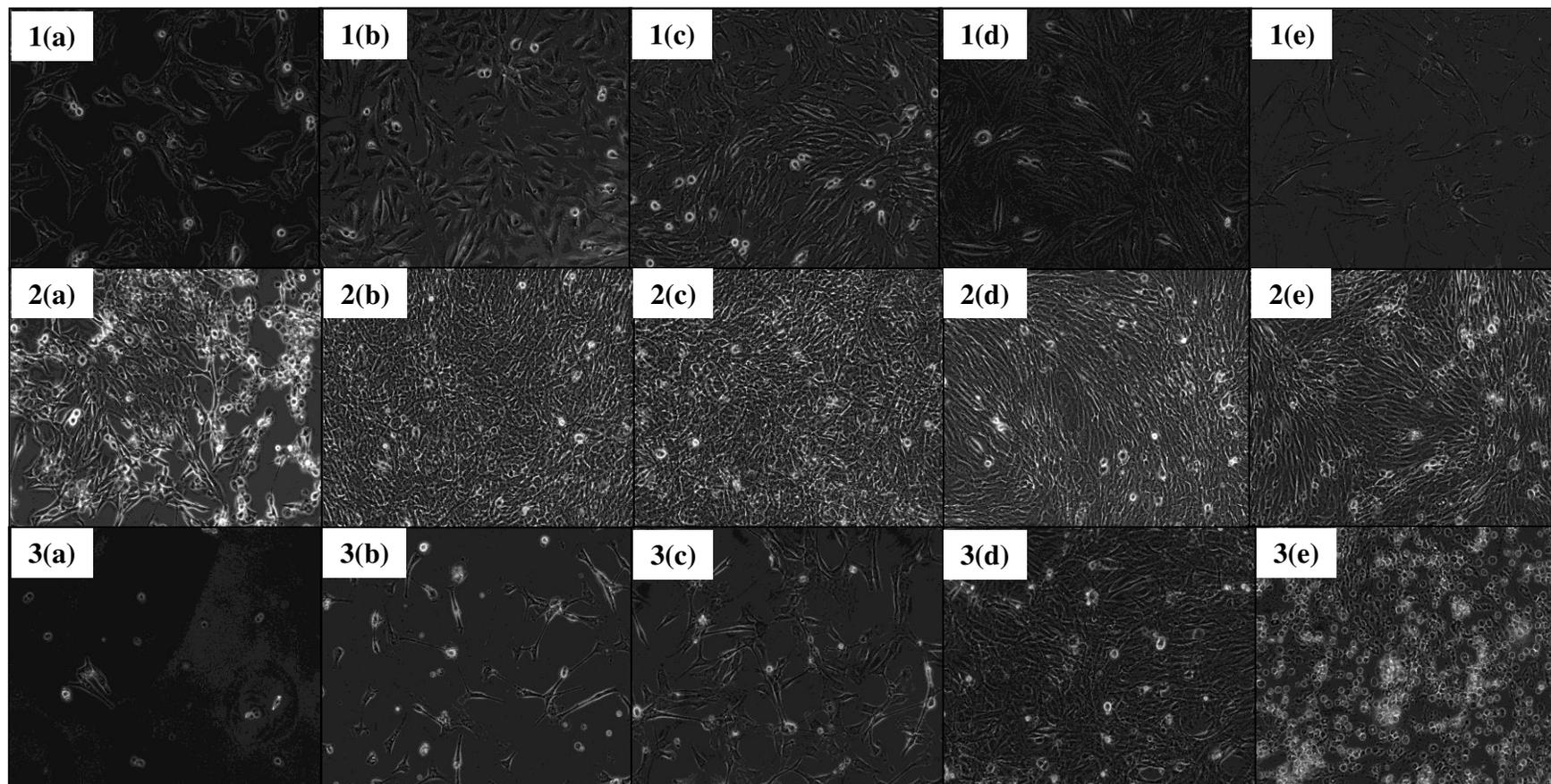


Figura 41: Imagens de microscopia de fluorescência da adesão e proliferação de células de mioblastos C2C12 incubadas no controle de vidro (a) e nos filmes *layer-by-layer* contendo fibronectina (CHI/SF)_{20,5} (b), (CHI/SF)₂₀ (c), (PAH/SF)_{20,5} (d) e (PAH/SF)₂₀ (e), no segundo (1), quarto (2) e sétimo (3) dia de cultura.

Conforme mostrado na Figura 41, não foi possível guiar a adesão e crescimento celular através do padrão de alinhamento imposto pelas fibrilas de fibroína. Em um estudo realizado por Cooper *et al.* (2010) com fibras de quitosana/policaprolactona obtidas por eletrofiação, verificou-se que os mioblastos C2C12 eram capazes de se alinhar conforme o alinhamento das fibras eletrofiadas, se diferenciando e formando miotubos alinhados. As fibrilas de fibroína obtidas em nosso estudo apresentam diâmetro semelhante (~200 nm) às fibras de quitosana/policaprolactona estudadas por Cooper *et al.* (2010). Porém, acredita-se que o fato das fibras eletrofiadas estarem presentes em uma estrutura 3D e mais disponíveis para o contato com as células possibilita o alinhamento e formação dos miotubos. Em nosso estudo, as fibrilas de fibroína estão presentes nas diversas camadas dos filmes, apresentando uma topografia final do filme com alguns pontos mais elevados, conforme visualizado por microscopia de força atômica anteriormente. Desta maneira, as fibrilas não estão totalmente disponíveis para o contato com as células, mas sim imersas no filme. Com isto, uma pequena variação da topografia do filme é obtida e possivelmente as células não são sensíveis o suficiente para sentir esta pequena variação. Apesar de não ter sido possível guiar a adesão e crescimento celular, os filmes obtidos não são tóxicos às células, podendo ser explorados em outras aplicações biomédicas, como no recobrimento de próteses e dispositivos médicos, por exemplo.

5.3 Conclusão Parcial

A deposição de fibrilas de fibroína pôde ser controlada ajustando-se o par polimérico utilizado no *layer-by-layer* com a fibroína. Foi observado que a formação das fibrilas não depende da solução utilizada para dissolver a fibroína nem da hidrofiliidade/hidrofobicidade do substrato. Verificou-se que a etapa de secagem é fundamental para a formação de uma estrutura estável folha- β da fibroína de seda e formação do filme. A formação de filmes LbL com fibroína ocorre devido a vários tipos de interações, entre elas interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. A densidade de cargas do par polimérico irá controlar a formação das fibrilas. Quando utilizado polímero com elevada densidade de cargas positivas, como o PAH, os agregados coloidais de fibroína ficarão estáveis, formando um filme contínuo. Por outro lado, quando utilizado um polímero com menor quantidade de cargas positivas, como é o caso da quitosana, a formação de fibrilas de fibroína será favorecida.

Apesar de muito interessante para uso como padrões para orientação celular, os filmes com fibrilas de fibroína não foram capazes de guiar o crescimento celular. Isto ocorre possivelmente devido ao fato das fibrilas estarem presentes nas diversas camadas do filme e não apenas em sua superfície. Com isso se tem uma diferença muito sutil na topografia final dos filmes, que as células não são capazes de reconhecer. De qualquer maneira, os filmes LbL de fibroína com quitosana e PAH não são tóxicos às células e podem ser utilizados como recobrimentos de próteses e dispositivos médicos, dispositivos de liberação controlada ou biossensores de moléculas específicas.

6 DISCUSSÃO FINAL

Foram apresentadas nesta tese duas diferentes formas de aplicação da fibroína de seda, em materiais bi- e tridimensionais, tanto na forma de microfibras processadas pelo bicho-da-seda, como na forma de fibrilas obtidas em laboratório a partir da solução de fibroína. Esta versatilidade da fibroína de seda e possibilidade de aplicação em diversas áreas é muito interessante, pois permite o desenvolvimento de materiais avançados a partir da fibroína, que pode ser combinada com outros materiais, tais como polímeros (naturais ou sintéticos), cerâmicas, entre outros.

Em nosso laboratório, a fibroína já foi utilizada no preparo de membranas densas e porosas (Nogueira, 2005), e o estudo da calcificação e esterilização destas membranas foi realizado (Weska, 2009). A solução de fibroína também foi manipulada para o preparo de hidrogéis (Nogueira *et al.*, 2011) e blendas com alginato de sódio (Moraes, 2010) e quitosana (Moraes *et al.*, 2010). Ainda, as fibras de fibroína foram utilizadas no preparo de compósitos com alginato de sódio, nos quais a fibroína atuou como reforço mecânico (Moraes e Beppu, 2013). Baseado nos estudos anteriores, buscou-se neste trabalho verificar a atuação da fibroína na forma de fibras micrométricas e nanométricas e avaliar principalmente seu desempenho mecânico e biológico quando combinada com diferentes materiais.

Em um primeiro momento, um *scaffold* em 3D foi desenvolvido, combinando hidrogel de colágeno com microfibras de fibroína, para aplicação em engenharia tecidual vascular. O objetivo principal da engenharia tecidual vascular é o desenvolvimento de um substituto vascular com propriedades mecânicas e biológicas semelhantes às apresentadas pelos vasos sanguíneos. Para atingir este objetivo, o *scaffold* deve fornecer suporte mecânico adequado para as células e definição da organização 3D do novo tecido. O colágeno vem sendo muito utilizado em substitutos vasculares, principalmente por ser uma das principais proteínas presentes na matriz extracelular (Weinberg e Bell, 1986). Porém, sua baixa resistência mecânica e estabilidade dimensional limitam seu uso. Por estes motivos, foi proposto neste estudo, a combinação do colágeno com outro excelente candidato para aplicações médicas, a fibroína de seda.

Um *scaffold* tridimensional foi desenvolvido nesta tese, combinando hidrogel de colágeno com microfibras de fibroína. Os *scaffolds* foram produzidos a partir da dispersão das microfibras de fibroína em uma solução de colágeno contendo sais e água, imediatamente antes da

gelificação. A dispersão das microfibras, morfologia e propriedades mecânicas (tensão, compressão e reologia) foram analisadas em termos de melhorias devido a incorporação das microfibras quando comparadas com o hidrogel de colágeno puro. Para avaliar o desempenho biológico do *scaffold* 3D, células musculares lisas foram incorporadas na solução de colágeno, antes da gelificação. A incorporação das células no hidrogel só foi possível devido às condições de processamento utilizadas no método proposto, que são ideais para a manutenção da viabilidade celular e proliferação no dispositivo.

Utilizando este método de preparo do *scaffold* foi possível desenvolver um material compósito, no qual microfibras de fibroína estavam uniformemente dispersas, com orientação aleatória, por todo o hidrogel de colágeno 3D. A uniformidade na dispersão 3D só foi possível devido às condições de gelificação utilizadas. Sabe-se que variações na concentração, pH, temperatura e força iônica afetam a cinética de gelificação do colágeno e também as propriedades do hidrogel resultante (Rosenblatt, Devereux e Wallace, 1994; Gobeaux *et al.*, 2008; Achilli, Lagueux e Mantovani, 2010). Nesta tese, optou-se por preparar os hidrogéis de colágeno em pH neutro e temperatura ambiente (~25°C), condições que permitiram uma dispersão uniforme das microfibras de fibroína em 3D devido à rápida gelificação (~15 min) e também possibilitaram a incorporação de células durante o preparo do hidrogel. Em casos de gelificação muito lenta, as microfibras de fibroína seriam depositadas no fundo da placa de Petri, resultando em baixa dispersão tridimensional. A gelificação lenta (acima de 30 minutos) também seria prejudicial às células, inviabilizando sua incorporação no hidrogel. Por outro lado, uma gelificação muito rápida resulta em hidrogéis com menor resistência mecânica do que hidrogéis preparados com gelificação lenta. Isto acontece porque em uma cinética de gelificação lenta as fibrilas de colágeno têm mais tempo para se auto-organizar, resultando em redes estruturais mais espessas e estáveis (Gobeaux *et al.*, 2008).

Durante os primeiros estágios de condicionamento em biorreator de fluxo pulsátil, o dispositivo precisa resistir a uma tensão e módulo de circunferência de 10 kPa e 100 kPa, respectivamente (Achilli e Mantovani, 2010). No presente estudo focou-se no preparo de hidrogéis de colágeno em condições fisiológicas, nos quais células pudessem ser misturadas durante o preparo dos hidrogéis e não apenas semeadas em sua superfície. A incorporação das células no hidrogel promove uma remodelagem celular mais rápida e eficiente. Foram preparados dispositivos de colágeno de forma cilíndrica tridimensional que foram capazes de dar suporte à

proliferação celular durante os sete dias de cultura. A Figura 42 apresenta as fotografias dos dispositivos logo após seu preparo e após 1 dia de cultura em molde de formato cilíndrico, onde pode se verificar a contração do hidrogel de colágeno (diminuição do diâmetro). Infelizmente não foi possível realizar testes mais detalhados dos dispositivos em formato cilíndrico tridimensional, porém acredita-se que os mesmos apresentariam bons resultados de proliferação celular e resistência mecânica para serem montados em biorreator.

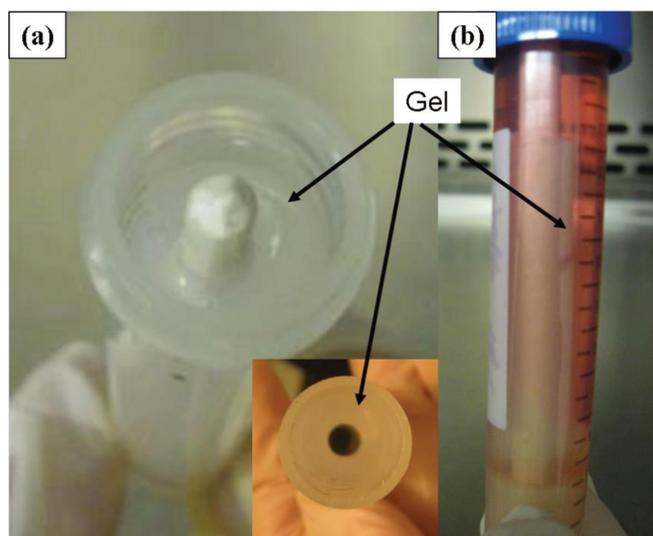


Figura 42: Fotografia do tubo de colágeno contendo células logo após preparo (a) e após 1 dia de cultura em formato cilíndrico (b).

Em um material compósito, a compatibilidade entre a matriz (colágeno) e o reforço (microfibras de fibroína) é o fator crucial que irá determinar o sucesso ou fracasso das melhorias de propriedade mecânica desejadas. Materiais compósitos são projetados de maneira a transferir a tensão mecânica diretamente da matriz para as fibras quando tensionados, caracterizando o efeito de reforço das fibras. Portanto, a transferência de tensão mecânica é consequência de uma boa aderência fibra/matriz (Cheung *et al.*, 2008). As imagens de MEV (Figura 9) mostraram que as fibrilas de colágeno são capazes de recobrir as microfibras de fibroína, indicando uma boa aderência interfacial. Esta compatibilidade é altamente desejada e resulta em melhorias nas propriedades mecânicas e estabilidade dimensional. Também é importante ressaltar que não foi realizado nenhum tipo de tratamento na superfície das microfibras, normalmente utilizados para aumentar a hidrofobicidade das fibras e, conseqüentemente, melhorar a aderência fibra/matriz e

adesão celular na superfície, resultando em materiais com melhores propriedades mecânicas e de biocompatibilidade. A literatura relata tratamentos de superfície feitos em fibras de fibroína como tratamento por plasma com CH₄ (Jeong *et al.*, 2009) ou dissolução parcial da fibroína em brometo de lítio (Yuan *et al.*, 2010), sendo que neste último caso foi relatado uma melhoria na tensão e deformação na ruptura de 60 para 151 MPa e de 2,1 para 27,1%, respectivamente.

A literatura também mostra que a combinação de fibroína com colágeno resulta em materiais com maior módulo de compressão (Lv *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008), e que hidrogéis de colágeno tem comportamento viscoelástico (Wu *et al.*, 2005; Stuart e Panitch, 2008), conforme observado nesta tese. Além disso, os valores de módulo de armazenamento e perda obtidos nesta tese são maiores ou da mesma magnitude que os melhores valores reportados por Wu *et al.* (2005) e Sundararaghavan *et al.* (2008) para hidrogéis de colágeno. Apesar de não terem sido observadas melhorias significativas devido à incorporação das microfibras de fibroína nos testes de tração e compressão, no nível macroscópico, esta melhoria foi observada através dos testes reológicos. Na reologia foi utilizada uma tensão de apenas 7 Pa, bastante inferior à tensão aplicada nos testes de tração e compressão, e foi possível verificar que o reforço devido à incorporação das microfibras acontece no nível microscópico, na microestrutura do hidrogel de colágeno. A partir dos testes reológicos foi possível demonstrar que a incorporação de microfibras de fibroína em hidrogéis de colágeno aumenta os módulos de armazenamento e perda do colágeno.

O objetivo principal do preparo de hidrogéis de colágeno microestruturados com fibroína foi utilizar apenas macromoléculas biológicas, em condições fisiológicas, nos quais células pudessem ser incorporadas no hidrogel, permitindo o desenvolvimento de um possível substituto vascular.

Os vasos sanguíneos são constituídos de três túnicas, chamadas adventícia, média e íntima. A túnica média é a responsável pela resistência mecânica e propriedades de vasoconstrição/vasodilatação dos vasos sanguíneos. Os principais componentes da túnica média são as células musculares lisas e a matriz extracelular, composta principalmente por colágeno do tipo I (Bou-Gharios *et al.*, 2004). Devido a estas características da túnica média foi escolhido desenvolver um substituto vascular baseado em colágeno reforçado e células musculares lisas.

Em nosso estudo, células musculares lisas da aorta de porcos foram diretamente incorporadas na solução de colágeno. Os resultados demonstraram que a combinação do colágeno

com as microfibras de fibroína é benéfica para a proliferação e crescimento celular. Além disso, a regulação da estabilidade dimensional e a redução da contração mediada pelas células foram alcançadas com a incorporação das microfibras de fibroína. Estes resultados provam que as microfibras de fibroína são capazes não somente de manter o desempenho biológico do colágeno, mas também de melhorá-lo. O aumento da estabilidade estrutural dos dispositivos torna este material ainda mais interessante, sendo esta propriedade necessária, por exemplo, em implantes de silicone. Em alguns casos, os implantes de silicone podem apresentar contratura capsular, fazendo com que o implante seja contraído, causando desconforto e dor ao paciente, além de assimetria entre os implantes. A utilização, por exemplo, de hidrogel de colágeno com microfibras de fibroína no recobrimento destes implantes poderia auxiliar no controle da contratura muscular, uma vez que uma maior estabilidade estrutural e menor contração induzida pelas células seriam alcançadas, conforme foi verificado nesta tese. Isto indica que os hidrogéis de colágeno reforçados com fibroína possuem potencial aplicação tanto em engenharia tecidual vascular, quanto em recobrimentos de implantes, apresentando propriedades desejadas para ambos os casos.

O melhor desempenho biológico pode ser atribuído à atividades específicas da fibroína e à influência da topografia dos dispositivos no comportamento das células musculares lisas. Na literatura alguns estudos já demonstraram a biocompatibilidade de matrizes de fibroína com diversos tipos de células (Zhang, Baughman e Kaplan, 2008; Nogueira *et al.*, 2010c) e que a geometria da matriz pode ser um fator determinante do comportamento celular (Min *et al.*, 2004; Pelaez-Vargas *et al.*, 2010). A interação célula-*scaffold* inicia pela deposição e adsorção de proteínas da matriz extracelular na superfície do *scaffold*. Os caminhos de sinalização celular são então ativados, afetando a adesão, proliferação e fenótipo celular. Esta interação é diferente dependendo do tipo de célula utilizada e possui limites ótimos que são determinados pela topografia da superfície. Uma topografia mais complexa resulta em maior grau de envolvimento do citoesqueleto e em maior tempo para adesão e proliferação celular (Andrews e Hunt, 2008).

A maior parte da literatura existente em *scaffolds* de colágeno/fibroína é baseada na adição de pequenas quantidades de colágeno em soluções de fibroína. Considerando que o colágeno tem mais sinais de reconhecimento celular que a fibroína, o aumento da biocompatibilidade nestes estudos deve-se provavelmente à presença do colágeno (Lu *et al.*, 2009). Por outro lado, nesta tese, o colágeno é o principal componente e, quando combinado com

as microfibras de fibroína, foi possível melhorar a adesão, espalhamento e proliferação celular. Esta melhoria está possivelmente associada também ao aumento da área superficial dos dispositivos devido à diminuição da contração induzida pelas células.

No segundo momento, um filme bidimensional, nanométrico, com múltiplas camadas, foi desenvolvido através da utilização do método conhecido como *layer-by-layer*, no qual fibrilas nanométricas de fibroína puderam ser obtidas a partir da manipulação da solução de fibroína e regulação das propriedades da superfície na qual o filme estava sendo depositado. Nesta etapa do estudo, elevado conhecimento a respeito da estrutura molecular e manipulação da solução de fibroína foi requerido, além da aplicação de técnicas utilizadas em nanotecnologia. Trata-se de um sistema bastante complexo, que combina uma solução proteica na região metaestável, capaz de se agregar na forma de fibrilas, com o confinamento em camadas nanométricas, resultante do método LbL. Este estudo teve início no trabalho desenvolvido por Nogueira *et al.* (2010b), no qual diversos questionamentos acerca da formação de fibrilas nanométricas de fibroína em filmes LbL com quitosana foram levantados.

Foram desenvolvidos filmes ultrafinos com múltiplas camadas, sendo analisada inicialmente a espessura dos filmes, tanto no estado seco quanto úmido, bem como o intumescimento, o ângulo de contato (usado para determinar a capacidade de interpenetração entre as camadas) e a capacidade de formação de fibrilas de fibroína nestes filmes. Nesta etapa foi verificada a influência do tipo de solução utilizada para dissolver a fibroína, do tipo de substrato utilizado (hidrofílico ou hidrofóbico) e do par polimérico [(quitosana ou hidrocloreto de poli(alilamina)] na formação dos filmes e na formação de fibrilas. A formação de fibrilas de fibroína nos filmes LbL foi estudada em detalhes, sendo levantadas algumas hipóteses a respeito da auto-organização da fibroína nestas estruturas. Foi analisada a caracterização química dos filmes, sendo possível determinar a conformação da fibroína, e foi analisado o comportamento mecânico dos filmes com fibrilas alinhadas uni- e bidirecionalmente. Por fim a viabilidade celular quando em contato com os filmes e a capacidade das fibrilas alinhadas em guiar a adesão e o crescimento celular também foram avaliadas.

Foi possível preparar filmes LbL de fibroína com quitosana e fibroína com hidrocloreto de poli(alilamina), com crescimento linear do filme e presença de interpenetração entre as camadas individuais. Filmes LbL com fibroína apresentam tipicamente crescimento linear, conforme observado por Wang *et al.* (2005), Nogueira *et al.* (2010b) e Moraes *et al.* (2013). Filmes LbL

podem apresentar dois tipos de crescimento: linear e exponencial. No crescimento linear os polieletrólitos são depositados por interações eletrostáticas e o crescimento ocorre devido à supercompensação das cargas. Neste tipo de filme cada camada de polieletrólito é capaz de penetrar apenas nas camadas vizinhas. Já no crescimento exponencial, o mecanismo de crescimento do filme está baseado na difusão de polieletrólitos para dentro e para fora do filme, em toda sua estrutura (Richert *et al.*, 2004). A análise de QCM-D realizada indicou uma diminuição da espessura dos filmes após cada adição de PAH ou de CHI. Este é um indicativo de mudança conformacional da fibroína, que assume uma estrutura mais compacta após a etapa de secagem ou de uma possível interpenetração entre as camadas com desorção da fibroína fracamente adsorvida, fenômeno já observado em filmes LbL de quitosana com outros materiais (Richert *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2006).

A interpenetração entre as camadas foi verificada por análise de ângulo de contato, onde não foi observada variação do ângulo de contato em função do polímero depositado no topo da superfície. Cai *et al.* (2007) estudaram filmes LbL de fibroína com quitosana depositados em lâminas de titânio e verificaram que os filmes com quitosana no topo apresentavam ângulo de contato de 65°, enquanto filmes com fibroína no topo apresentavam ângulo de contato em torno de 36°, representando interfaces bem definidas. Este resultado difere substancialmente do resultado de ângulo de contato obtido nesta tese e está possivelmente relacionado à metodologia de preparo dos filmes. Cai *et al.* (2007) não utilizaram as etapas de secagem após a deposição de cada camada polimérica. Porém, imergiam o substrato em solução de ácido acético 0,2% após a deposição de cada camada de quitosana, além de utilizar uma etapa de imersão em EDC 0,1% após a deposição de cada bicamada para fixar a estrutura chitosana/fibroína. Possivelmente este protocolo de preparo dos filmes possibilitou a formação de camadas bem definidas, sem interpenetração. Além disso, os valores de ângulo de contato para os filmes com fibroína no topo obtidos por Cai *et al.* (2007) são menores do que os valores obtidos nesta tese (aproximadamente 77°) e do que os obtidos por Jin *et al.* (2004) em filmes densos de fibroína de seda com estrutura folha- β (81°), possivelmente devido à metodologia de preparo e conformação destes filmes.

O uso de diferentes soluções para dissolver a fibroína não exerceu influência na formação das fibrilas. Este resultado difere do sugerido por Nogueira *et al.* (2010b), no qual é proposto que uma dissolução insuficiente das fibras de fibroína estaria causando a presença de nanofibrilas em solução, sendo estas fibrilas transferidas ao substrato como filmes de Langmuir-Blodgett.

Entretanto, após uma série exaustiva de experimentos, foi possível confirmar nesta tese que o uso de diferentes soluções para dissolver a fibroína não interfere em sua capacidade de formar fibrilas em filmes LbL com quitosana. Além disso, a literatura relata a formação de fibrilas de fibroína quando dissolvida em solução 9,3 M de LiBr (Chen *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2012) e quando utilizada fibroína extraída diretamente da glândula do bicho-da-seda (Greving *et al.*, 2012), vindo a confirmar a hipótese de que a formação de fibrilas de fibroína não depende do tipo de solução utilizada. A divergência com relação aos resultados obtidos por Nogueira *et al.* (2010b) pode estar associada à matéria-prima utilizada. Nogueira *et al.* (2010b) utilizou em seus estudos fibras de fibroína de seda fornecidas diretamente pela indústria, que podem conter quantidade elevada de óleos, surfactantes, entre outros. Por outro lado, nesta tese foram usados casulos do bicho-da-seda, matéria-prima mais pura e sem a presença de nenhum tipo de aditivo.

Diversos peptídeos sintéticos são capazes de se auto-organizar formando estruturas nanométricas, tais como nanofibras, tubos e estruturas em formato de anel. É sabido que proteínas naturais como a amiloide são capazes de formar estruturas de nanofibrilas, sob certas condições fisiológicas. Em geral, as nanofibrilas são observadas durante a transição da estrutura amorfa para a estrutura folha- β (Gong *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2009). As nanofibrilas auto-organizadas são normalmente formadas no *bulk* da proteína. Porém, em alguns casos, a formação de fibrilas é observada em superfícies. Neste caso, a morfologia final do material está relacionada com as propriedades físico-químicas da superfície do substrato, tais como hidrofobicidade e carga (Hwang *et al.*, 2009).

Estudos sobre fibrilas de fibroína modificada com elastina indicam que a densidade de cargas e hidrofobicidade do substrato afetam diretamente a formação de fibrilas e que as interações hidrofóbicas não são suficientes para governar a auto-organização em fibrilas, sendo as interações eletrostáticas fundamentais nesta formação (Hwang *et al.*, 2009). Nesta tese foram utilizados substratos de vidro e de silício, ambos hidrofílicos e carregados negativamente, e substrato de ZnSe, hidrofóbico. Para todos os substratos utilizados foi observada a presença de fibrilas de fibroína quando preparados filmes LbL com quitosana, mesmo sem a deposição da pré-camada de PDAC/SPS. Por outro lado, a presença de fibrilas não foi observada em nenhum dos substratos quando preparados os filmes com fibroína e PAH. Estes resultados indicam que o substrato exerce pouca influência na deposição de fibrilas de fibroína em filmes LbL. Porém, a superfície

na qual a fibroína esta sendo depositada (polímero presente no topo do filme) irá determinar fortemente a formação das fibrilas.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que, na escala nanométrica, a densidade de cargas da superfície é o principal fator que governa a formação das fibrilas de fibroína em filmes LbL. Considerando que a deposição da fibroína em filmes LbL ocorre por interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, pode-se supor que o uso de PAH, um polímero com maior densidade de cargas positivas irá estabilizar os agregados coloidais de fibroína carregados negativamente, que poderão, então, ser depositados de forma bem dispersa, formando um filme contínuo. Por outro lado, quando utilizado um polímero com baixa densidade de carga positiva no LbL, como é o caso da quitosana, as cargas presentes na superfície não serão capazes de estabilizar os agregados coloidais da fibroína. Neste caso, as interações fibroína-fibroína são mais fortes do que as interações fibroína-quitosana e então ocorrerá a formação das fibrilas.

Acredita-se que as fibrilas de fibroína são formadas pela combinação de diversos fatores, principalmente pela concentração da solução, pela carga das moléculas e pela interação com a superfície, resultado que está de acordo com os relatos da literatura (Lu *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Desta maneira, se aceita que a formação de fibrilas de fibroína em solução é menos intensa do que a formação na superfície. Esta hipótese também explica a formação intensa de fibrilas nos filmes SF/SF (Figura 32), nos quais não há uma superfície capaz de estabilizar os agregados coloidais (uma vez que esta superfície é composta por camadas apenas de fibroína) e as fibrilas de fibroína são formadas. Além disso, foram realizados testes de espalhamento de luz na solução de fibroína e o tamanho das partículas (fibrilas) não variou significativamente em 4 dias de análise, indicando que as fibrilas não estão sendo formadas ou aumentadas de tamanho na solução durante a construção dos filmes.

O entendimento do processo de formação de fibrilas de fibroína ainda não é completamente compreendido na literatura e a análise da formação de fibrilas em filme LbL, bem como as hipóteses formuladas nesta tese são inéditos. Os resultados obtidos fornecem uma maior compreensão a respeito da formação de fibrilas de fibroína em filmes LbL. Pode-se concluir que a força de interação com o par polimérico irá definir a formação ou não das fibrilas, sendo as mesmas formadas quando a interação com o par polimérico é fraca. Com relação à estrutura das fibrilas não se pode afirmar se as mesmas são formadas pelo alinhamento de agregados coloidais

(Lu *et al.*, 2012) ou pelo estiramento das moléculas de fibroína durante a formação de estrutura folha- β (Chen *et al.*, 2008).

Os resultados de caracterização química dos filmes LbL indicaram a presença de uma estrutura estável de fibroína. A transição de seda I para seda II normalmente é realizada através de imersão de filmes de fibroína em solventes orgânicos, como etanol e metanol (Nogueira *et al.*, 2010a), pela exposição dos filmes a temperaturas elevadas (Kawahara, Furukawa e Yamamoto, 2006) ou umidade (Jin *et al.*, 2005) ou por cisalhamento (Jin e Kaplan, 2003). Porém, uma estrutura estável também foi observada em outras pesquisas com filmes ultrafinos LbL com fibroína (Wang *et al.*, 2005), e foi atribuída principalmente ao processo de secagem entre as camadas, que estabiliza as moléculas de fibroína e permite a deposição da próxima camada. Esta estabilização durante a etapa de secagem também foi verificada nesta tese, onde não foi possível formar um filme de fibroína quando utilizado um processo completamente úmido, sem a etapa de secagem entre as camadas.

A possibilidade de formar um padrão alinhado para guiar o crescimento celular é muito interessante, principalmente visando aplicações que requerem estruturas com orientação definida. Um *scaffold* nanofibroso, com orientação unidirecional é um excelente candidato para reconstrução de tecido muscular lesado, por exemplo. Em tecidos como músculos, o alinhamento celular é crucial para a formação de miotubos organizados e reconstrução do tecido anisotrópico com comportamento mecânico similar ao do tecido lesado (Cooper *et al.*, 2010).

Para o estudo da capacidade dos filmes nanoestruturados com fibroína em guiar a adesão e crescimento celular foram utilizados mioblastos, que são as células precursoras das fibras musculares. Os resultados obtidos mostraram que as fibrilas não são capazes de induzir um padrão para o crescimento celular. Acredita-se que a baixa disponibilidade das fibrilas na superfície e elevação sutil da topografia final dos filmes devido à presença das fibrilas nas camadas internas não é suficiente para que as células reconheçam esta superfície como um padrão para adesão e crescimento.

De qualquer maneira, os filmes não são tóxicos às células e são candidatos potenciais para aplicações em biomateriais, tais como biossensores de moléculas específicas, engenharia do sistema imune, sistemas de diagnóstico e tratamento de doenças, bem como no recobrimento de dispositivos médicos para aumentar a biocompatibilidade, na liberação controlada de medicamentos, entre outros, podendo ser explorados para estes usos em trabalhos futuros.

Além disso, foi observado um aumento na força necessária para penetrar os filmes contendo fibrilas cruzadas (CHI/SF)_{10x10} quando comparado com os demais filmes. A possibilidade de preparar filmes LbL mais resistentes é interessante em aplicações nas quais estes filmes não estarão ligados ao substrato (*free-standing films*). Por exemplo, a funcionalização de células de linfócitos com filmes LbL com liberação controlada de fármacos (Swiston *et al.*, 2008) exige que estes filmes tenham uma boa resistência mecânica, uma vez que eles sofrerão as tensões impostas pelo fluxo sanguíneo e pela própria mobilidade da célula.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que a fibroína pode ser processada em diversos formatos, como fibras micrométricas ou nanométricas, combinada com diferentes materiais, atuando como reforço mecânico ou como superfície biocompatível, podendo ser aplicada em diversas áreas do campo biomédico.

7 CONCLUSÃO

Foi possível preparar materiais micro e nanoestruturados com fibroína de seda combinada a outros polímeros, tanto em estruturas tridimensionais na forma de hidrogéis, quanto em estruturas bidimensionais na forma de filmes ultrafinos. Hidrogéis de colágeno foram reforçados com fibroína de seda, apresentando maior integridade estrutural e também melhor desempenho biológico, sendo possível diminuir a contração induzida pelas células e aumentar a proliferação celular quando microfibras de fibroína foram adicionadas aos hidrogéis de colágeno. Para o caso dos filmes ultrafinos, foi possível controlar a formação de fibrilas nanométricas de fibroína através do uso de pares catiônicos com diferentes densidades de cargas utilizados na formação de filmes multicamadas *layer-by-layer* pelo método de imersão. Os filmes multicamadas com fibrilas de fibroína não foram capazes de guiar a adesão e crescimento celular. Apesar disso, estes filmes não são tóxicos às células, podendo ser utilizados em outras áreas do campo biomédico. Através da realização deste estudo foi possível verificar a versatilidade da fibroína de seda, podendo ser utilizada tanto em sua forma original, em microfibras, quanto através da manipulação da solução de fibroína de seda, que se mostrou capaz de se auto-organizar formando nanofibrilas.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a incorporação de fibras de fibroína contínuas e alinhadas nos hidrogéis de colágeno, podendo formar estruturas de rede que iriam exercer reforço mecânico anisotrópico;

- Estudar tratamentos de superfície nas microfibras de fibroína, de maneira a aumentar a aderência interfacial e, conseqüentemente, melhorar as propriedades mecânicas do material no qual as fibras serão incorporadas.

- Analisar a cinética de gelificação do colágeno contendo microfibras de fibroína por reologia.

- Realizar testes mecânicos e de reologia após a incorporação das células no hidrogel de colágeno contendo fibroína.

- Estudar a formação de fibrilas de fibroína em *layer-by-layer* com outros polímeros, com densidade de carga e hidrofiliidade variadas.

- Verificar a formação de agregados coloidais e fibrilas de fibroína através de estudos de espalhamento de luz estático e dinâmico, bem como através de medidas de potencial zeta e incorporação de marcadores, a fim de se determinar o mecanismo de formação de fibrilas.

- Estudar a possibilidade de aplicar um processo de reticulação dos filmes após a deposição de cada camada no lugar da etapa de secagem, de maneira a preparar um filme com menor intumescimento e provavelmente melhor adesão celular.

- Estudar o comportamento da fibroína de seda quando dissolvida em cloreto de lítio, uma alternativa não tóxica ao brometo de lítio, utilizado nesta tese.

- Explorar o uso de filmes *layer-by-layer* com fibroína em biorreatores e biossensores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU NEEL, E. A. et al. Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties. **Soft Matter**, v. 2, n. 11, p. 986-992, 2006.
- ABRAMSON, S. et al. Classes of materials used in medicine. In: RATNER, B. D.;HOFFMAN, A., *et al* (Ed.). **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p.67-233.
- ACHILLI, M.; LAGUEUX, J.; MANTOVANI, D. On the effects of UV-C and pH on the mechanical behavior, molecular conformation and cell viability of collagen-based scaffold for vascular tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 3, p. 307-316, 2010.
- ACHILLI, M.; MANTOVANI, D. Tailoring mechanical properties of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: the effects of pH, temperature and ionic strength on gelation. **Polymers**, v. 2, p. 664-680, 2010.
- ACHILLI, M. et al. Mechano-compatible collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: Low doses of UV affect the viscoelastic behaviour. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 5, p. 878-878, 2008.
- ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003.
- AMADORI, L. et al. Atomic force and confocal microscopic studies of collagen-cell-based scaffolds for vascular tissue engineering. **Advanced Materials Research**, v. 15-17, p. 83-88, 2007.

- ANDREWS, K. D.; HUNT, J. A. Upregulation of matrix and adhesion molecules induced by controlled topography. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 1601-1608, 2008.
- ANTIPOV, A. A. et al. Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 12, p. 2281-2284, 2001.
- ARAI, T. et al. Preparation of silk fibroin and polyallylamine composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 84, n. 11, p. 1963-1970, 2002.
- BEPPU, M. M.; POLAKIEWICZ, B.; NOGUEIRA, G. M. **Processo de obtenção de membranas porosas de fibroína de seda**. INPI/Brasil, PI : 0601975-7, 2006.
- BERG, S. Beyond the Cell: **Extracellular Structures, Cell Adhesion and Cell Junctions**. Disponível em: < <http://course1.winona.edu/sberg/308s08/Lecture/Extracellular.htm#kinds%20of%20collagen> >. Acesso em: 16 de novembro de 2011.
- BHATTARAI, N. et al. Alginate-based nanofibrous scaffolds: Structural, mechanical, and biological properties. **Advanced Materials**, v. 18, n. 11, p. 1463-1467, 2006.
- BILODEAU, K. et al. Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses. **Artificial Organs**, v. 29, n. 11, p. 906-912, 2005.
- BILODEAU, K.; MANTOVANI, D. Bioreactors for tissue engineering: Focus on mechanical constraints. A comparative review. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 8, p. 2367-2383, 2006.
- BOCCAFOSCHI, F. et al. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7410-7417, 2005.

- BOCCAFOSCHI, F. et al. Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembling of collagen and cells in a cylindrical geometry. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 5, p. 719-726, 2007.
- BOU-GHARIOS, G. et al. Extra-cellular matrix in vascular networks. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 3, p. 207-220, 2004.
- BOUDOU, T. et al. Internal composition versus the mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films: The influence of chemical cross-linking. **Langmuir**, v. 25, n. 24, p. 13809-13819, 2009.
- CAI, K.; HU, Y.; JANDT, K. D. Surface engineering of titanium thin films with silk fibroin via layer-by-layer technique and its effects on osteoblast growth behavior. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82A, n. 4, p. 927-935, 2007.
- CAI, Z. X. et al. Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3529-3539, 2010.
- CARDENAS, G. et al. Chitosan composite films. Biomedical applications. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19, n. 6, p. 2397-2405, 2008.
- CEBECI, F. C. et al. Nanoporosity-driven superhydrophilicity: A means to create multifunctional antifogging coatings. **Langmuir**, v. 22, n. 6, p. 2856-2862, 2006.
- CHAJRA, H. et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. **Biomedical Materials and Engineering**, v. 18, p.S33-S45, 2008.
- CHEN, X. et al. Conformation transition kinetics of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 25-34, 2001a.

- CHEEN, X. et al. Regenerated *Bombyx* silk solutions studied with rheometry and FTIR. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 9969-9974, 2001b.
- CHEEN, P. et al. pH-triggered transition of silk fibroin from spherical micelles to nanofibrils in water. **Macromolecular Research**, v. 16, n. 6, p. 539-543, 2008.
- CHEUNG, H. Y. et al. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B-Engineering**, v. 38, n. 3, p. 291-300, 2007.
- CHEUNG, H. Y. et al. A potential material for tissue engineering: Silkworm silk/PLA biocomposite. **Composites Part B-Engineering**, v. 39, n. 6, p. 1026-1033, 2008.
- CHOI, J.; RUBNER, M. F. Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. **Macromolecules**, v. 38, n. 1, p. 116-124, 2005.
- CLARK, S. L.; HAMMOND, P. T. The role of secondary interactions in selective electrostatic multilayer deposition. **Langmuir**, v. 16, n. 26, p. 10206-10214, 2000.
- COOPER, A. et al. Aligned chitosan-based nanofibers for enhanced myogenesis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 40, p. 8904-8911, 2010.
- COUET, F.; MANTOVANI, D. Experimental validation of a new approach for the development of mechano-compatible composite scaffolds for vascular tissue engineering. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19, n. 7, p. 2551-2554, 2008a.
- COUET, F.; MANTOVANI, D. How to optimise the maturation conditions in a bioreactor? toward an intelligent bioreactor for vascular tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 5, p. 858-858, 2008b.

- COUET, F.; MANTOVANI, D. How to optimize maturation in a bioreactor for vascular tissue engineering: Focus on a decision algorithm for experimental planning. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 38, n. 9, p. 2877-2884, 2010.
- COUET, F.; RAJAN, N.; MANTOVANI, D. Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 5, p. 701-718, 2007.
- COUET, F. et al. Design of a collagen/silk mechano-compatible composite scaffold for the vascular tissue engineering: focus on compliance. **Key Engineering Materials**, v. 334-335, p. 1169-1172, 2007.
- CUMMINGS, C. L. et al. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3699-3706, 2004.
- DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- DECHER, G.; SCHLENOFF, J. B. **Multilayer thin films - Sequential assembly of nanocomposite materials**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 535.
- DU, C. L. et al. Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: Structure and properties. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 29, n. 1, p. 62-68, 2009.
- ELZBIECIAK, M.; KOLASINSKA, M.; WARSZYNSKI, P. Characteristics of polyelectrolyte multilayers: The effect of polyion charge on thickness and wetting properties. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 321, n. 1-3, p. 258-261, 2008.
- FENG, Z. et al. Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. **Artificial Organs**, v. 27, n. 1, p. 84-91, 2003.

FREYMAN, T. M.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. **Progress in Materials Science**, v. 46, n. 3-4, p. 273-282, 2001.

GOBEAUX, F. et al. Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 5, p. 1509-1522, 2008.

GONG, Z. et al. Two distinct beta-sheet fibrils from silk protein. **Chemical Communications**, n. 48, p. 7506-7508, 2009.

GREVING, I. et al. Shear-induced self-assembly of native silk proteins into fibrils studied by atomic force microscopy. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 676-682, 2012.

GUZIEWICZ, N. et al. Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2642-2650, 2011.

HABERMEHL, J. et al. Preparation of ready-to-use, stockable and reconstituted collagen. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 9, p. 821-828, 2005.

HAKIMI, O. et al. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. **Composites Part B-Engineering**, v. 38, n. 3, p. 324-337, 2007.

HARRIS, A.; GONSALVES, R. Collagen. 2011. Disponível em: <
<https://chempolymerproject.wikispaces.com/Collagen+-+B-+rgam> >. Acesso em: 16 de novembro de 2011.

HINO, T.; TANIMOTO, M.; SHIMABAYASHI, S. Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 266, n. 1, p. 68-73, 2003.

- HORAN, R. L. et al. *In vitro* degradation of silk fibroin. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3385-3393, 2005.
- HU, K. et al. Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 84A, n. 2, p. 483-490, 2008.
- HU, X. A. et al. Biomaterials from ultrasonication-induced silk fibroin-hyaluronic acid hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3178-3188, 2010.
- HWANG, W. et al. Surface induced nanofiber growth by self-assembly of a silk-elastin-like protein polymer. **Langmuir**, v. 25, n. 21, p. 12682-12686, 2009.
- IRUTHAYARAJ, J. et al. Adsorption of low charge density polyelectrolyte containing poly(ethylene oxide) side chains on silica: Effects of ionic strength and pH. **Macromolecules**, v. 38, n. 14, p. 6152-6160, 2005.
- ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular and surface forces**. 2 ed. London: Academic Press, 1992. 480.
- JEONG, L. et al. Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 3, p. 222-228, 2009.
- JIANG, C. Y. et al. Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. **Advanced Functional Materials**, v. 17, p. 2229-2237, 2007.
- JIN, H. J.; KAPLAN, D. L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. **Nature**, v. 424, n. 6952, p. 1057-1061, 2003.
- JIN, H. J. et al. Biomaterial films of *Bombyx mori* silk fibroin with poly(ethylene oxide). **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 711-717, 2004.

- JIN, H. J. et al. Water-stable silk films with reduced beta-sheet content. **Advanced Functional Materials**, v. 15, n. 8, p. 1241-1247, 2005.
- JOHNSON, S. et al. Directed patterning of the self-assembled silk-elastin-like nanofibers using a nanomechanical stimulus. **Chemical Communications**, v. 48, n. 86, p. 10654-10656, 2012.
- KAWAHARA, Y.; FURUKAWA, K.; YAMAMOTO, T. Self-expansion behavior of silk fibroin film. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 291, n. 5, p. 458-462, 2006.
- KI, C. S.; PARK, Y. H.; JIN, H. J. Silk protein as a fascinating biomedical polymer: Structural fundamentals and applications. **Macromolecular Research**, v. 17, n. 12, p. 935-942, 2009.
- KIM, I.-Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2008.
- KIM, U. J. et al. Structure and properties of silk hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 786-792, 2004.
- KO, H. F.; SFEIR, C.; KUMTA, P. N. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1917, p. 1981-1997, 2010.
- KOTOV, N. A. Layer-by-layer self-assembly: The contribution of hydrophobic interactions. **Nanostructured Materials**, v. 12, n. 5-8, p. 789-796, 1999.
- KOZLOVSKAYA, V. et al. Hydrogen-bonded multilayers of silk fibroin: from coatings to cell-mimicking shaped microcontainers. **Acs Macro Letters**, v. 1, n. 3, 2012.

- KREGER, S. T. et al. Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. **Biopolymers**, v. 93, n. 8, p. 690-707, 2010.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.
- LAI, G. L.; LI, Y.; LI, G. Y. Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 285-291, 2008.
- LEE, D.; COHEN, R. E.; RUBNER, M. F. Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles. **Langmuir**, v. 21, n. 21, p. 9651-9659, 2005.
- LEE, J.-H. et al. In situ fibril formation of kappa-casein by external stimuli within multilayer thin films. **Acs Macro Letters**, v. 2, n. 8, p. 688-693, 2013.
- LI, G. Y. et al. The natural silk spinning process - A nucleation-dependent aggregation mechanism? **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 24, p. 6600-6606, 2001.
- LI, M. Z. et al. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, n. 2, p. 89-94, 2002.
- LICHTER, J. A.; RUBNER, M. F. Polyelectrolyte multilayers with intrinsic antimicrobial functionality: The importance of mobile polycations. **Langmuir**, v. 25, n. 13, p. 7686-7694, 2009.

- LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 85, n. A7, p. 1051-1064, 2007.
- LU, Q. et al. Preparation of three-dimensional fibroin/collagen scaffolds in various pH conditions. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 629-634, 2008.
- LU, Q. et al. Growth of fibroblast and vascular smooth muscle cells in fibroin/collagen scaffold. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 29, n. 7, p. 2239-2245, 2009.
- LU, Q. et al. Silk fibroin electrogelation mechanisms. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2394-2400, 2011.
- LU, Q. et al. Silk self-assembly mechanisms and control from thermodynamics to kinetics. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 826-832, 2012.
- LV, Q. et al. Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: Preparation, properties, and cytocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 84A, n. 1, p. 198-207, 2008.
- LV, Q. A. et al. Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12662-12669, 2005.
- MACINTOSH, A. C. et al. Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 2-3, p. 71-80, 2008.
- MATHEWS, A. et al. Vascular tissue construction on poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by dynamic endothelial cell seeding: effect of pore size. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 6, n. 6, p. 451-461, 2012.

- MENČÍK, J. Uncertainties and errors in nanoindentation. In: NEMECEK, J. (Ed.). **Nanoindentation in Materials Science**. Croacia: InTech, 2012. p.53-86.
- MIN, B. M. et al. Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 5, p. 281-288, 2004.
- MIYAUCHI, M.; TOKUDOME, H. Low-reflective and super-hydrophilic properties of titanate or titania nanotube thin films via layer-by-layer assembly. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 4, p. 2091-2096, 2006.
- MONTI, P. et al. Structure modifications induced in silk fibroin by enzymatic treatments. A Raman study. **Journal of Molecular Structure**, v. 744, p. 685-690, 2005.
- MORAES, M. A. **Obtenção e caracterização de blendas e compósitos poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio**. 2010. 116 (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MORAES, M. A. et al. Preparation and characterization of insoluble silk fibroin/chitosan blend films. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 719-727, 2010.
- MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. Biocomposite membranes of sodium alginate and silk fibroin fibers for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, p. 3451-3457, 2013.
- MORAES, M. L. et al. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. **Langmuir**, v. 29, n. 11, p. 3829-3834, 2013.

- MORI, H.; TSUKADA, M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 95-103, 2000.
- NARAYAN, D.; VENKATRAMAN, S. S. Effect of pore size and interpore distance on endothelial cell growth on polymers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87A, n. 3, p. 710-718, 2008.
- NOGUEIRA, G. M. **Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial**. 2005. 78 (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- NOGUEIRA, G. M. **Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para fabricação ou recobrimento de biomateriais**. 2009. 150 (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- NOGUEIRA, G. M. et al. A new method to prepare porous silk fibroin membranes suitable for tissue scaffolding applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, n. 1, p. 617-623, 2009.
- NOGUEIRA, G. M. et al. Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8446-8451, 2010a.
- NOGUEIRA, G. M. et al. Layer-by-layer deposited chitosan/silk fibroin thin films with anisotropic nanofiber alignment. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8953-8958, 2010b.
- NOGUEIRA, G. M. et al. Bovine pericardium coated with biopolymeric films as an alternative to prevent calcification: In vitro calcification and cytotoxicity results. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 30, n. 4, p. 575-582, 2010c.

- NOGUEIRA, G. M. et al. Hydrogels from silk fibroin metastable solution: Formation and characterization from a biomaterial perspective. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 31, n. 5, p. 997-1001, 2011.
- O'LEARY, L. E. R. et al. Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 821-828, 2011.
- OGAWA, T. et al. Super-hydrophobic surfaces of layer-by-layer structured film-coated electrospun nanofibrous membranes. **Nanotechnology**, v. 18, n. 16, p. 8, 2007.
- PANG, Y. G.; GREISLER, H. P. Using a type 1 collagen-based system to understand cell-scaffold interactions and to deliver chimeric collagen-binding growth factors for vascular tissue engineering. **Journal of Investigative Medicine**, v. 58, n. 7, p. 845-848, 2010.
- PAYNE, G. F.; RAGHAVAN, S. R. Chitosan: a soft interconnect for hierarchical assembly of nano-scale components. **Soft Matter**, v. 3, n. 5, p. 521-527, 2007.
- PELAEZ-VARGAS, A. et al. Early spreading and propagation of human bone marrow stem cells on isotropic and anisotropic topographies of silica thin films produced via microstamping. **Microscopy and Microanalysis**, v. 16, n. 6, p. 670-676, 2010.
- POLAK, R. et al. Sensitive and rapid detection of prostate-specific antigen with functionalized polyelectrolyte multilayer films. No prelo, 2014.
- PRYSE, K. M. et al. Incremental mechanics of collagen gels: New experiments and a new viscoelastic model. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 31, n. 10, p. 1287-1296, 2003.
- PUTTHANARAT, S. et al. Effect of processing temperature on the morphology of silk membranes. **Polymer**, v. 43, n. 12, p. 3405-3413, 2002.

- QIANG, L. et al. The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 15, n. 11, p. 1193-1197, 2004.
- RAJAN, N. et al. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2753-2758, 2006.
- RAJAN, N. et al. Low doses of ultraviolet radiation stimulate cell activity in collagen-based scaffolds. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 884-889, 2008.
- RAJKHOWA, R. et al. Fabrication of ultrafine powder from eri silk through attritor and jet milling. **Powder Technology**, v. 191, n. 1-2, p. 155-163, 2009.
- RATNER, B. D. et al. Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor. In: RATNER, B. D.;HOFFMAN, A. S., *et al* (Ed.). **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p.1-9.
- REN, Y. J. et al. Preparation and characterization of fibroin/hyaluronic acid composite scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 372-378, 2009.
- RICHERT, L. et al. Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects. **Langmuir**, v. 20, n. 2, p. 448-458, 2004.
- ROCKWOOD, D. N. et al. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612-1631, 2011.
- ROEDER, B. A. et al. Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. **Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme**, v. 124, n. 2, p. 214-222, 2002.

- ROMANAZZI, G. et al. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1028-1036, 2009.
- ROSENBLATT, J.; DEVEREUX, B.; WALLACE, D. G. Injectable collagen as a pH-sensitive hydrogel. **Biomaterials**, v. 15, n. 12, p. 985-995, 1994.
- RUSA, C. C. et al. Conformational changes induced in *Bombyx mori* silk fibroin by cyclodextrin inclusion complexation. **Macromolecules**, v. 38, n. 13, p. 5640-5646, 2005.
- SASHINA, E. S. et al. Structure and solubility of natural silk fibroin. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 869-876, 2006.
- SCHNEIDER, A. et al. Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films. **Biomedical Materials**, v. 2, n. 1, p. S45-S51, 2007.
- SELIKTAR, D. et al. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling *in vitro*. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 351-362, 2000.
- SHCHEPELINA, O. et al. Silk-on-silk layer-by-layer microcapsules. **Advanced Materials**, v. 23, n. 40, 2011.
- SILKWOOD SILK™ **The molecular structure of silk.** Disponível em: <http://www.silkwoodsilk.com/blog/2011/06/22/the-molecular-structure-of-silk>. Acesso em: 16 de novembro de 2011.
- SRISUWAN, Y.; SRIHANAM, P.; BAIMARK, Y. Preparation of silk fibroin microspheres and its application to protein adsorption. **Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 521-525, 2009.

- STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F. Molecular-level processing of conjugated polymers .4. Layer-by-layer manipulation of polyaniline via hydrogen-bonding interactions. **Macromolecules**, v. 30, n. 9, p. 2717-2725, 1997.
- STUART, K.; PANITCH, A. Influence of chondroitin sulfate on collagen gel structure and mechanical properties at physiologically relevant levels. **Biopolymers**, v. 89, n. 10, p. 841-851, 2008.
- SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589-2598, 2000.
- SUNDARARAGHAVAN, H. G. et al. Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87A, n. 2, p. 308-320, 2008.
- SVENSSON, O. et al. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan - Influence of surface properties, concentration and type of mucin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, n. 2, p. 608-616, 2006.
- SWISTON, A. J. et al. Surface functionalization of living cells with multilayer patches. **Nano Letters**, v. 8, n. 12, p. 4446-4453, 2008.
- TERRY, A. E. et al. pH induced changes in the rheology of silk fibroin solution from the middle division of *Bombyx mori* silkworm. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 768-772, 2004.
- UM, I. C. et al. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 91-97, 2001.
- VASCONCELLOS, F. C. et al. Bioactive polyelectrolyte multilayers: hyaluronic acid mediated B lymphocyte adhesion. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 9, p. 2407-2414, 2010.

- VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 991-1007, 2007.
- VIEIRA, R. S. et al. Adsorption and desorption of binary mixtures of copper and mercury ions on natural and crosslinked chitosan membranes. **Adsorption-Journal of the International Adsorption Society**, v. 13, n. 5-6, p. 603-611, 2007.
- WANG, X. Q. et al. Silk microspheres for encapsulation and controlled release. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 3, p. 360-370, 2007.
- WANG, X. Y. et al. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. **Langmuir**, v. 21, n. 24, p. 11335-11341, 2005.
- WANG, Y. et al. *In vivo* degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. **Biomaterials**, v. 29, n. 24-25, p. 3415-3428, 2008a.
- WANG, X. Q. et al. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1054-1064, 2008b.
- WEINBERG, C. B.; BELL, E. A blood-vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. **Science**, v. 231, n. 4736, p. 397-400, 1986.
- WESKA, R. F. **Estudo da esterilização e da calcificação *in vitro* de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial**. 2009. 88 (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterial. Proceedings of a consensus conference of the European Society for biomaterials, 1987, Chester. Elsevier. p.5.

- WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.
- WU, C. C. et al. Mechanical properties of collagen gels derived from rats of different ages. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 16, n. 10, p. 1261-1275, 2005.
- XAVIER, A. C. F.; DE MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Immobilization of aloin encapsulated into liposomes in layer-by-layer films for transdermal drug delivery. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 3, p. 1193-1196, 2013.
- XIAO, W. et al. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2384-2393, 2011.
- YAN, X.; ZHU, P.; LI, J. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 6, p. 1877-1890, 2010.
- YUAN, Q. Q. et al. The preparation of high performance silk fiber/fibroin composite. **Polymer**, v. 51, n. 21, p. 4843-4849, 2010.
- ZHANG, X. H.; BAUGHMAN, C. B.; KAPLAN, D. L. *In vitro* evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. **Biomaterials**, v. 29, n. 14, p. 2217-2227, 2008.
- ZHANG, Y. J. et al. Fabrication of stable hollow capsules by covalent layer-by-layer self-assembly. **Macromolecules**, v. 36, n. 11, p. 4238-4240, 2003.
- ZHOU, J. et al. *In vitro* and *in vivo* degradation behavior of aqueous-derived electrospun silk fibroin scaffolds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 9, p. 1679-1685, 2010.